



Synthese et evaluation biologique de derives de l'aminobenzosuberone, inhibiteurs puissants et selectifs de l'aminopeptidase N ou CD13

Sarah Alavi

► To cite this version:

Sarah Alavi. Synthese et evaluation biologique de derives de l'aminobenzosuberone, inhibiteurs puissants et selectifs de l'aminopeptidase N ou CD13. Chimie organique. Université de Haute Alsace - Mulhouse, 2013. Français. NNT : 2013MULH4071 . tel-01223670

HAL Id: tel-01223670

<https://theses.hal.science/tel-01223670>

Submitted on 3 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Présentée et soutenue
par :

Sarah ALAVI

Le jeudi 28 novembre 2013

THESE

En vue de l'obtention du
Doctorat de l'Université
de Haute-Alsace

Spécialité : Chimie Organique

*Synthèse et évaluation biologique de dérivés de l'amino-benzosubérone,
inhibiteurs puissants et sélectifs de l'Aminopeptidase N ou CD13.*

Ecole Doctorale :

Jean Henri-Lambert 494 – Pôle Chimie, Physique et Matériaux

Unité de recherche :

Laboratoire de Chimie Organique et Bioorganique (COB) – EA 4566

Directeurs de Thèse :

Pr Céline TARNUS (COB – UHA Mulhouse)
Dr Philippe BISSERET (COB – UdS Strasbourg)

Rapporteurs :

Dr Jean-Bernard BEHR (ICMR – Univ. Champagne-Ardenne Reims)
Dr Siden TOP (Lab. Charles Friedel – ENSCP Paris)

Examineur :

Pr Christine GERARDIN (LERMaB – UL Nancy)

A la mémoire d'Adham Pirnia,

A mes parents,

Et à tous ceux qui me sont chers ...

AVANT-PROPOS

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire COB dirigé par le Pr Céline Tarnus, tout d'abord à l'ENSCMu (de novembre 2009 à mai 2011) puis à l'Institut Jean-Baptiste Donnet (depuis juin 2011). Elle a été codirigée par le Pr Céline Tarnus et le Dr Philippe Bisseret, chargé de recherche CNRS.

La Fondation pour l'ENSCMu, l'Université de Haute-Alsace et le laboratoire COB ont assuré le soutien financier de mes travaux de thèse.

Dans le cadre de la Chaire ACTELION, j'ai eu l'opportunité de faire un stage d'échange international de 2 mois à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biomédicales de l'Université de Nagasaki sous la direction du Pr Masakazu Tanaka.

REMERCIEMENTS

Effectuer une thèse est, pour beaucoup de mes confrères, un projet de recherche réalisé sur une période déterminée... Ma définition de la thèse est beaucoup plus personnelle et au travers de ce chapitre intitulé « Remerciements », j'en présenterai quelques alinéas.

Mes premiers remerciements s'adressent tout naturellement au Pr Céline Tarnus, ma directrice de thèse qui au-delà des très bonnes relations professionnelles que nous avons entretenues, a su me faire confiance dès mon premier jour. Bien que très occupée par ses instances, elle a toujours su m'accueillir dans son bureau comme à son domicile pour répondre à mes innombrables questions. J'exprime également toute ma gratitude à Philippe Bisseret. Je ne mesure toujours pas la chance que j'ai eue de l'avoir en tant que directeur de thèse. Je suis très admirative de son savoir aussi bien en chimie que dans la vie de tous les jours en passant par l'art « cactéen ».

Je remercie également les membres de ce jury, à savoir le Dr Jean-Bernard Behr, le Dr Siden Top et le Pr Christine Gerardin, pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail et d'avoir accepté d'honorer le jury de leur présence.

A présent je me tourne auprès de tous ceux qui ont collaboré avec moi, de près comme de loin, tout au long de ma thèse.

Tout d'abord, Didier, je te suis extrêmement reconnaissante pour toutes les heures que tu as consacrées à m'aider dans mes travaux de thèse. Ta détermination et ton génie en matière d'analyse spectroscopique sont exemplaires. Sans avoir fait le tour des labos du monde entier, je suis certaine que tu es le meilleur et inégalable. Cécile, depuis le déménagement du laboratoire, que tu as orchestré d'une main de maître, nos relations n'en sont que meilleures. Tout comme Didier, et bien que ton emploi du temps soit plus restreint, tu as toujours pris le temps de répondre à mes questions avec la pointe de fermeté qu'on te connaît. Albert, même si de votre temps, toutes les réactions marchaient et que depuis rien ne va plus, je vous assure que j'ai fait de mon mieux pour suivre tous les conseils que vous

avez eu la gentillesse de me prodiguer et ce, même une fois que vous aviez pris votre retraite. J'ai hâte de vous revoir pour converser (tant bien que mal) en allemand. Manu, ou devrais-je dire PerManuTor, tu as été d'une grande patience avec moi, et surtout à mes débuts. Fabienne, nos bonnes relations étaient bien souvent extra professionnelles, et c'est tant mieux, il n'y a pas que la Science dans la vie... 🎵 Marjorie, je ne sais plus si tu étudies la tribologie des bactéries ou le clonage des matériaux mais une chose est sûre, tu le fais avec brio ! Aline, je pense que même plusieurs jours après mon départ, je rêverais de bons de commande et d'ordres de mission, mais je me souviendrais surtout de ta gentillesse avec, parfois, un grain de malice. Sébastien, ou l'homme le plus jeune au monde connaissant le plus de choses, je ne sais pas si c'est ta grande taille ou ta grande envie de tout savoir qui fait de toi un scientifique exceptionnel, mais je ne doute pas un instant que tu feras (et fais déjà) de brillantes choses.

Bien que je n'aie pas effectué ma thèse dans l'université la plus prestigieuse au monde, il est indéniable que mes collègues du COB sont extraordinaires. J'ai réellement eu une chance inouïe d'être dans une équipe regorgeant de scientifiques tous plus épatants les uns que les autres. Si Mulhouse se situait près de la mer ou proche de domaines skiables, notre université serait certainement au Top10 du classement mondial ! En effet, Nicolas, même si je n'ai pas étroitement travaillé avec toi, il est certain que tu es un emblème de l'excellence en chimie, ici... et ailleurs. Tu t'es d'ailleurs entouré de gens qui seront sûrement, un jour, à ta hauteur : Cédric, qui d'une certaine manière est déjà un Grand homme, Stéphane, le « djeuns zarb », Anne-K, une mycolactone pas comme les autres, Morgan, le « réparator d'évaporator rotatif » (et que je remercie au passage tout particulièrement pour les nombreuses fois où il m'a aidée), Théo, mon fournisseur officiel de plantes vertes et de précieux conseils, et enfin Samir, mon compagnon de thèse avec qui nous avons partagé une belle aventure au Japon.

Durant ma thèse, j'ai non seulement eu l'opportunité de faire de l'enseignement mais aussi de mieux connaître des chercheurs qui sont également des pédagogues et ont bien d'autres cordes à leur arc. Un grand merci à Delphine, Samuel, Hélène, Anna, le Pr Serge Neunlist, Vice-Président de l'UHA, et le Pr Pierre Llopiz, directeur de l'ENSCMu pour m'avoir acceptée comme l'une des vôtres durant l'année 2012-2013. Après avoir été votre étudiante (préférée, je n'en doute pas !) durant les 8 années (voire plus) à l'UHA, je suis passée de votre côté et j'ai continué à apprendre à vos côtés.

Je ne peux évidemment pas oublier de remercier ceux qui étaient là quand je suis arrivée et qui sont devenus aujourd'hui de grands et vrais Docteurs ! Lionel, ton amitié compte beaucoup pour moi, et, je te remercie d'avoir supporté mes milliards de « désolée » et « Sarades ». Emel, nos voyages sont sans doute les meilleurs souvenirs que j'ai de nous. A quand notre périple sur la route de l'Orient Express ? Céline, j'ai failli parler de tes belles jambes... dire que tu es une femme formidable me semble plus approprié. Mira, ton élégance est à la hauteur de ta générosité de cœur et de tes irrésistibles petits gâteaux libanais. Et Hamid, j'ai envie de dire « Tout pareil » pour te dire merci.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement mes collègues de fin de thèse. Ma chère VeryNice, je pense être ta plus grande fan, et à juste titre : tu es géniale ! Ton équipe à une chance inouïe de t'avoir et je suis certaine que tu es promise à un bel avenir. Bryce, ta bonne humeur et ton petit brin de folie font de toi un super collègue, ne change pas. Thomas, je ne connais pas de personne plus dévouée et serviable que toi. Je te remercie pour tout ce que tu as fait et feras pour moi, car je sais que je pourrais toujours compter sur toi. Germain, il serait de bon aloi que je t'adresse toute ma profonde gratitude et « remercititude » pour toute l'aide et le soutien que tu m'as généreusement apportés. Tu n'as jamais compté les heures pour m'aider et sans toi, il est certain que je n'y serai pas arrivée. Et ma chère Aurély... ma chère collègue de galère. Je ne sais pas si ce sont tes beaux yeux noisette à la pointe de miel, ou toutes les émotions que nous avons eues ensemble que je retiendrai. Mais une chose est sûre, j'ai vécu des moments inoubliables avec toi. Et tu sais quoi ? Je crois que je deviens biologiste !!!

Merci beaucoup pour la « Chem Touch » de mes jeunes collaborateurs : Marine, Didy, Amélie, Arnaud et Florian. Je suis très fière de vous et vous souhaite à tous une très belle continuation!

Je remercie enfin la belle Farida, Davide, Didier Le Rouzic, Rahim et Estelle car sans eux, il faut l'avouer, je n'aurais pas pu travailler dans de si bonnes conditions !

De toutes ces années de thèse, je retiens surtout la richesse des personnes que j'ai eu la chance de rencontrer. A refaire, je changerai évidemment bien des stratégies de synthèse mais pour rien au monde je ne voudrais d'autres collègues que vous. Encore Merci à vous tous.

LISTE DES ABREVIATIONS

APN	A mino P eptidase- N eutre
CD ₅₀	C urative D ose 50 %
Col AP	C old active A mino P eptidase
Cyp-450	C ytochrome P450
DFT	D ensity F unctional T heory
EAT	E hrlich A scitic T umor
EC	E nzyme C ommission numbers
ePepN	A mino P eptidase- N eutre d' <i>E</i> scherichia coli
ERAP	E ndoplasmic R eticulum A mino P eptidase
Fe(III)PPIX	Fe(III) - P ro P orphyrine IX = Hématine
HAEC	H uman A ortic E ndothelial C ells
hAPN	A mino P eptidase- N eutre h umaine
HMEC	H uman M ammary E pithelial C ells
HOMO	H ighest O ccupied M olecular O rbital
HRCE	H uman R enal C ortical E pithelial cells
HUVEC	H uman U mbilical V ein E ndothelial C ells
IC ₅₀	I nhibition C oncentration 50 %
K _i	Constante d'inhibition
LTA ₄ H	L euko T riene A ₄ H ydrolase
LUMO	L owest U noccupied M olecular O rbital
MES	2-(N - M orpholino) E thane S ulfonic acid
mTOR	m ammalian T arget O f R apamycin
MVD	M icro V essels D iameter
NHEK-Ad	H uman E pidermal K eratinocyte, A dult
NHEK-Neo	H uman E pidermal K eratinocyte, N eonatal
OH-Tam	H ydroxy T amoxifène

OM	O rbitale M oléculaire
p.t.t.	p ost t ransplantationem t umoris
pAPN	A mino P eptidase- N eutre p orcine
PBS	P hosphate B uffer S olution
PDB	P rotein D ata B ank
<i>PfA-M1</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> A mino p eptidase M1
<i>PfCRT</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> C hloroquin R esistant T ransporter
pI	p oint I soélectrique
RHL	R edox-switchable H emilabile L igand
ROS	R eactive O xygen S pecies
RT-PCR	R everse T ranscription - P olymerase C hain R eaction
SAR	S tructure- A ctivity R elationship
T/C	ratio du volume moyen des tumeurs du groupe T raité sur le groupe C ontrôle
TIFF3	T ricorn I nteracting F actor F3
TUNEL	T erminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d U TP N ick E nd L abeling
VEGF	V ascular E ndothelial G rowth F actor

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	19
CHAPITRE I	21
CHAPITRE I : L' APN, UNE CIBLE THERAPEUTIQUE DE CHOIX	23
I. L' APN, ETAT DE L' ART	23
A. L' APN est une protéine multifonctionnelle	23
B. L' APN est une aminopeptidase	26
C. L' APN est une ectoenzyme	28
D. L' APN est une métalloprotéase	30
II. LES INHIBITEURS DE L' APN ET LEURS MODES DE LIAISON	37
A. Les complexes APN - bestatine	37
1. Complexe APN <i>E. coli</i> - bestatine	37
2. Complexe APN porcine - bestatine	39
3. Complexe APN humaine - bestatine	42
B. Les complexes APN - 1a	48
1. Complexe APN <i>E. coli</i> - 1a	48
2. Complexe APN humaine - 1a	52
III. STRATEGIE ANTICANCEREUSE ETUDIEE AU LABORATOIRE – THERAPIE ANTIANGIOGENIQUE ET CYTOTOXIQUE	54
A. Positionnement du projet	54
B. Inhibition des APNs porcine, murine et humaine	56
C. Evaluations in vitro des dérivés 1a, 1b et 1c	57
1. Action des inhibiteurs sur la formation de tubes capillaires sur HUVEC	57
2. Influence des inhibiteurs sur la motilité cellulaire sur HUVEC, Caco2/TC7	58
D. Evaluations in vivo des dérivés 1a et 1b	60
1. Effets des inhibiteurs sur la croissance de tumeurs xénogreffées	60
2. Effets de 1a en combinaison avec un cytotoxique potentiel : la Rapamycine	62
IV. CONCLUSION	66

Chapitre II : Nouvelles voies de synthèse de l'inhibiteur le plus puissant de l'APN	69
I. PREMIERES SYNTHESES REGIOSELECTIVES EN SERIE RACEMIQUE	69
A. Description de la synthèse n°1	72
1. Accès au système conjugué γ -benzosubérone	72
2. Accès aux dérivés d'amines allyliques	73
3. Accès au dérivé α -amino-cétone par la voie principale	74
4. Accès au dérivé α -amino-cétone par la voie de recyclage	76
5. Accès au dérivé chlorhydrate d'ammonium 1a	76
II. VERS UNE NOUVELLE VOIE DE SYNTHÈSE REGIOSELECTIVE EN SERIE RACEMIQUE	79
A. Accès au dérivé clé dibromé via une réaction de Sandmeyer	79
B. Synthèse de l'intermédiaire α -énone	80
C. Couplage de Suzuki régio-contrôlé	81
III. VERS UNE NOUVELLE VOIE DE SYNTHÈSE EN SERIE OPTIQUEMENT ACTIVE	84
A. Cyclisation intramoléculaire de Büchner	85
B. Borylation régio-contrôlée	88
C. Couplage de Chan-Lam	89
1. Mécanisme supposé du couplage de Chan-Lam	89
2. Etude du couplage de Chan-Lam à partir d'acide phénylboronique et de phényltrifluoroborate de potassium.	91
3. Etude du couplage de Chan-Lam à partir du dérivé 2-bromo-5-iodophényltrifluoroborate de potassium	93
D. Couplage de Mitsunobu	93
E. Réaction de Arndt-Eistert	94
1. Obtention du dérivé diazocétone directement à partir de l'ester méthylique 44	95
2. Saponification de l'ester méthylique 44	97
IV. CONCLUSION	99

Chapitre III : Synthèse et évaluation biologique de dérivés ferrocéniques	103
I. LE FERROCENE	103
A. Une révolution dans la chimie organométallique	103
B. Sa structure moléculaire et ses propriétés électroniques	104

C. Son comportement vis-à-vis de l'oxygène et ses propriétés redox	106
D. La réactivité du ferrocène et ses limites	108
E. Le ferrocène, un motif de choix pour la synthèse de ligands	112
F. La chiralité planaire des ferrocènes	114
G. Exemples de molécules bioactives comportant un groupement ferrocène et leur mode d'action	115
1. Les sels de ferricinium	115
2. L'hydroxyferrocifène, un bioisostère du tamoxifène	117
3. Etude d'un autre anticancéreux contenant un motif ferrocène	123
4. La ferroquine - un antipaludéen prometteur	127
II. SYNTHÈSE ET EVALUATION BIOLOGIQUE DE DERIVES DE L'AMINO-BENZOSUBERONE COMPORTANT UN OU DEUX GROUPEMENTS FERROCENES	129
A. Vers la synthèse des dérivés ferrocényles	129
1. Synthèse du dérivé 53	129
2. Synthèse du dérivé 54, 55 et 56	136
3. Synthèse du dérivé 57	143
B. Evaluation biologique d'une nouvelle génération de composés inhibiteurs de l'APN	144
1. Leur activité inhibitrice sur l'APN de porc	144
2. Etude de solubilité	147
3. La cytotoxicité des dérivés ferrocényles	149
4. L'activité inhibitrice du dérivé 54 sur l'APN d' <i>E. coli</i>	153
III. CONCLUSION	155
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	157
<u>ANNEXES</u>	161
<u>PARTIE EXPERIMENTALE</u>	175
I. ANALYSES HPLC	175
II. TESTS ENZYMATIQUES	178
III. SYNTHÈSES	179
A. Généralités	179
B. Réactifs et Solvants	179
C. Modes opératoires et analyses	180

INTRODUCTION GENERALE

Au sein de nos laboratoires, nous participons au développement de nouvelles thérapies ciblées pour diminuer les risques de récurrence et de rechute métastatique après résection chirurgicale de tumeurs cancéreuses. Les faibles gains en termes de survie et la toxicité élevée des drogues de chimiothérapie amènent à proposer de nouvelles approches pour réduire l'apparition d'effets secondaires et améliorer significativement la réponse au traitement en utilisant des associations de drogues. L'utilisation de molécules anti-angiogéniques dans des modèles expérimentaux de tumeurs solides a montré l'efficacité de cette thérapie sur la croissance et la dissémination tumorale.

Un des candidats potentiels est l'Aminopeptidase N (APN) ou CD13 : enzyme protéolytique¹ surexprimée sur les cellules cancéreuses et les cellules endothéliales angiogéniques.^{2,3,4} Elle est considérée aujourd'hui comme un régulateur important de la morphogénèse endothéliale au cours du processus d'angiogenèse. De plus, cette enzyme est également impliquée dans le processus de migration et de prolifération métastatique dans de nombreux types de cancer.^{1,5,6,7} L'inhiber interférerait à la fois sur le processus de morphogénèse endothéliale et sur la dissémination des cellules tumorales.

¹ A. J. Barret, N. D. Rawling, J. F. Woessner, 2nd ed. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*; Elsevier Academic Press: Oxford, **2004**, Vol. 2

² K. Fukasawa, H. Fujii, Y. Saitoh, K. Koizumi, Y. Aozuka, K. Sekine, M. Yamada, I. Saiki, K. Nishikawa, K. Fukasawa *Cancer Lett.* **2006**, *243*, 135-143

³ N. Petrovic, W. Schacke, J. R. Gahagan, C. A. O'Connor, B. Winnicka, R. E. Conway, P. Mina-Osorio, L. H. Shapiro *Blood* **2007**, *110*, 142-150

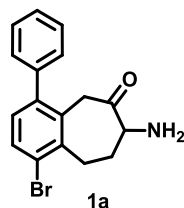
⁴ R. Rangel, Y. Sun, L. Guzman-Rojas, M. G. Ozawa, J. Sun, R. J. Giordano, C. S. Van Pelt, P. T. Tinkey, R. R. Behringer, R. L. Sidman *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 4588-4593

⁵ P. Mina-Osorio *Trends Mol. Chem.* **2008**, *14*, 361-371

⁶ S. V. Bhagwat, J. Lahdenranta, R. Giordano, W. Arap, R. Pasqualini, L. H. Shapiro *Blood* **2001**, *97*, 652-659

⁷ T. Wex, U. Lendeckel, D. Reinhold, T. Kähne, M. Arndt, K. Frank, S. Ansorge *Adv. Exp. Med. Biol.* **1997**, *421*, 67-73

Après plusieurs années de recherches, notre équipe a mis au point l'inhibiteur **1a** (Figure 1) le plus puissant de l'APN avec une constante d'inhibition de 60 pM. Un brevet a ainsi été déposé pour ce composé et ses analogues.⁸



$K_i = 60 \text{ pM}$

Figure 1 : Inibiteur **1a** le plus puissant de l'APN, connu à ce jour.

Interférer avec le phénomène d'angiogenèse n'est cependant pas suffisant pour éradiquer la tumeur. Nous avons mené des études en collaboration avec le Dr Dominique Guénot (EA3430 - Progression tumorale et microenvironnement - Strasbourg) qui ont montré un effet synergique de nos molécules avec des agents cytotoxiques utilisés en clinique. A partir de ces données, nous avons décidé de concevoir une seule molécule pouvant posséder des propriétés : anti-angiogéniques, de part son squelette de type amino-benzosubérone et cytotoxiques intrinsèques, grâce à l'introduction d'un groupement ferrocényle.

Ce travail de thèse s'articule ainsi autour de trois axes principaux qui constituent les trois chapitres de ce manuscrit :

- L'étude de l'APN en tant que cible anticancéreuse potentielle
- La synthèse et le développement de nouvelles voies d'accès à **1a** plus performantes
- La synthèse et l'évaluation biologique d'une nouvelle génération de composés possédant une entité organométallique de type ferrocène

⁸ Brevet : WO/2008/059141

CHAPITRE I

L' APN, une cible thérapeutique de choix

Le mode d'action des traitements médicaux fait généralement intervenir des interactions entre une (des) molécule(s) et une (des) cible(s) protéique(s) de l'organisme. Au sein de notre laboratoire, notre choix s'est porté vers l'APN, protéine connue, depuis les années 2000, pour être impliquée dans les processus d'angiogenèse e.g. la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants, et de migration cellulaire. Dans le domaine de l'oncologie, cibler efficacement cette protéine permettrait éventuellement d'inhiber l'angiogenèse tumorale et de freiner la croissance de la tumeur. Cette thèse a été particulièrement étudiée ces dernières années : elle a été à l'origine de nos travaux.

*Dans ce chapitre sont rapportés, dans un premier temps, les phénomènes biologiques dans lesquels l'APN humaine est impliquée et les concepts structuraux relatifs aux APN de bactéries et de mammifères. Bien que les structures d'APN d'*Escherichia coli* (ePepN)⁹ et d'autres aminopeptidases de la même famille soient connues depuis plusieurs années, il aura fallu attendre août 2012 pour que la structure tridimensionnelle de l'APN humaine¹⁰ soit résolue par une équipe canadienne. Ces travaux ont contribué à la compréhension des relations existantes entre le pouvoir inhibiteur du composé **1a** et son mode de liaison à l'APN humaine à partir de données expérimentales obtenues au laboratoire sur l'enzyme d'*E. coli*. Cette analyse fera l'objet de la seconde partie de ce chapitre. Enfin, en troisième partie de chapitre, seront mis en lumière les effets in vivo de nos inhibiteurs sur des tumeurs coliques humaines xénogreffées sur souris : étude menée en collaboration avec le Dr Dominique Guénot.*

⁹ A. Addlagatta, L. Gay L, B. W. Matthews *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 13339-13344

¹⁰ A. H. Wong, D. Zhou, J. M. Rini *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 36804-36813

Chapitre I : L' APN, une cible thérapeutique de choix

I. L'APN, état de l'art

L'APN est une protéine membranaire,¹¹ isolée et identifiée pour la première fois dans le rein de porc, au début des années 60, par Pfleiderer *et al.*¹² Elle présente de nombreuses caractéristiques fonctionnelles et structurelles dont les principales seront présentées dans cette partie.

A. L'APN est une protéine multifonctionnelle

L'APN est une enzyme présente chez les mammifères (*e.g.* APN humaine et de porc), les bactéries (*e.g.* ePepN) et les végétaux (*e.g.* *Beta vulgaris*). Chez l'Homme, le gène codant pour cette protéine se trouve dans le chromosome 15.¹³ Elle est exprimée,¹⁴ entres autres, sur :

- les cellules endothéliales en cours d'angiogenèse : HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), HAEC (*Human Aortic Endothelial Cells*), ...
- les épithéliums du rein et des intestins
- le système nerveux : membranes synaptiques et péricytes
- les cellules myéloïdes : monocytes, macrophages, ...
- les cellules de type fibroblaste
- certaines lignées cancéreuses

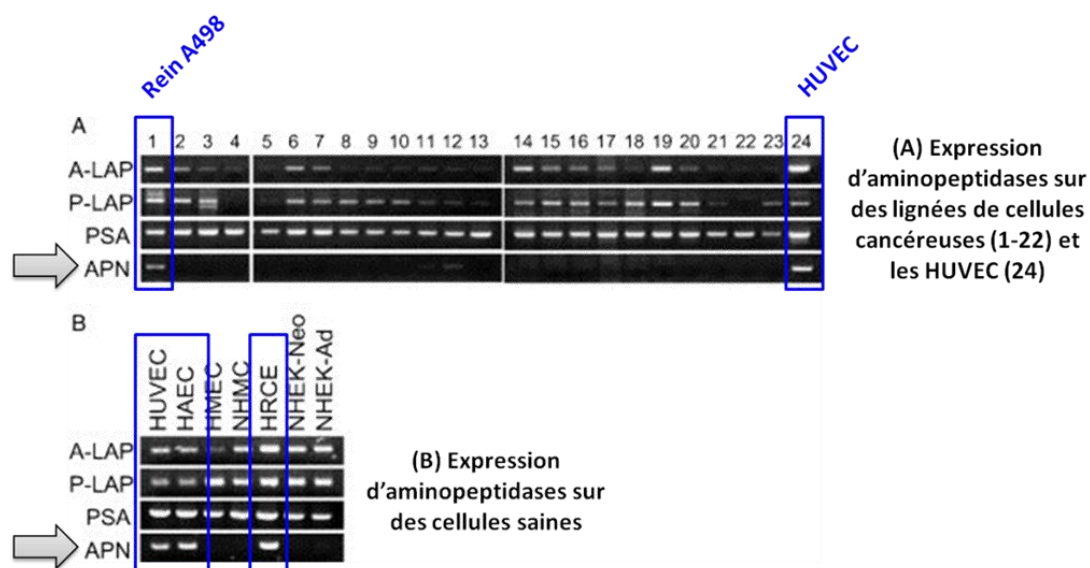
Elle est dite ubiquitaire, ce qui est une caractéristique valable pour la plupart des aminopeptidases de la famille M1 (cf p. 30). Fukasawa *et al.* ont montré que l'APN est exprimée dans quelques types cellulaires sains (B) mais qu'elle est peu représentée sur les lignées cancéreuses (A), contrairement à d'autres aminopeptidases (Figure 2).²

¹¹ <http://www.uniprot.org/uniprot/P15144> consulté le 20 octobre 2013

¹² G. Pflleiderer, P. G. Celliers *Nierenpartikeln Biochem. Z.* **1963**, 339, 186-189

¹³ V. M. Watt, H. F. Willard *Genet.* **1990**, 85, 651-654

¹⁴ E. J. Favaloro *Immunol. Cell Biol.* **1991**, 69, 253-260



- **(A)** 1: A498 (rein), 2: ACHN (rein), 3: DLD-1 (côlon), 4: HCT-116 (côlon), 5: MALME-3M (peau), 6: MKN-45 (estomac), 7: MDA-MN-231 (sein), 8: HOP-18 (poumon), 9: MIA-PaCa-2 (pancréas), 10: NCI-H460 (poumon), 11: OVCAR3 (ovarien), 12: PC-3 (prostate), 13: U251 (cerveau), 14: A431 (peau), 15: A549 (poumon), 16: ALVA-101 (prostate), 17: MCF-7 (sein), 18: SKOV-3 (ovarien), 19: 2008C (ovarien), 20: MDA-MB-453 (sein), 22: NEC-8 (testicules). 21: HEK293 (*Human Embryonic Kidney*), 23: placenta, 24: HUVEC

- **(B)** HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), HAEC (Human Aortic Endothelial Cells), HMEC (Human Mammary Epithelial Cells), HRCE (Human Renal Cortical Epithelial cells), NHEK-Neo (Human Epidermal Keratinocyte, souche néonatale), NHEK-Ad (Human Epidermal Keratinocyte, souche adulte)

Figure 2 : Expression d'aminopeptidases dont l'APN sur des lignées cellulaires cancéreuses (A) et saines (B) à partir d'analyses RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction).²

L'APN semble être impliquée dans des processus biologiques multiples 5 pouvant se résumer, à ce jour, en trois catégories :

- catalyse enzymatique (la plus connue)
- voie d'endocytose
- voie de signalisation

En tant qu'enzyme, tout d'abord, elle a pour rôle principal de réguler l'activité des peptides. Bien qu'elle soit une enzyme coupant uniquement la position *N*-terminale d'un peptide, il semblerait qu'elle participe également à la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire telles que le collagène IV. Toutefois, à ce jour, ce phénomène n'a été vérifié qu'*in vitro*.¹⁵

Dans le cas de certaines maladies infectieuses, l'APN est également considérée comme un récepteur d'endocytose et met en jeu, cette fois, des processus indépendants de la catalyse.

¹⁵ I. Saiki, J. Yoneda, I. Azuma, H. Fuji, F. Abe, M. Nakajima, T. Tsuruo *Int. J. Cancer* **1993**, 54, 137-143

Elle possède un site de reconnaissance pouvant établir des interactions moléculaires avec par exemple, le coronavirus humain 229E (HCoV-229E).¹⁶

Enfin, et ce bien que la littérature nous renseigne peu, il semblerait que l'APN soit impliquée dans la transduction de signaux - fonction indépendante de son activité enzymatique. Le domaine intracellulaire de l'APN représentant moins de 1 % de sa totalité - correspondant au domaine protéique généralement impliquée dans ce type de processus - et qu'aucun motif classique induisant une transduction de signal n'est présent, il est peu probable que cette fonction soit inhérente à l'APN seule. Pour permettre la transduction du signal, l'APN devrait s'associer à des protéines extracellulaires ou membranaires (*e.g.* la galectine) et initier ainsi une cascade de signalisation.^{17,18} Ces partenaires potentiels restent, à ce jour, encore à être définis et validés.

Sa présence particulière sur des cellules endothéliales en cours d'angiogenèse ainsi que sur certaines cellules tumorales, fait de cette protéine une cible intéressante en oncologie. De plus, selon les modèles de cancer, l'APN sera plus ou moins fortement exprimée. Inhiber l'APN permettrait de ralentir le processus d'angiogenèse et de migration cellulaire.⁶ Cette protéine pourrait être alors une cible intéressante dans le cadre de notre étude, à savoir, la mise en place d'un traitement anticancéreux ciblé qui sera abordé en partie III de ce chapitre (cf. p. 54).

¹⁶ A. F. Kolb, A. Hegyi, J. Maile, A. Heister, M. Hagemann, S. G. Siddell *Adv. Exp. Med. Biol.* **1998**, 440, 61-67

¹⁷ E. Yang, J. S. Shim, H.-J. Woo, K.-W. Kim, H. J. Kwon *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2007**, 363, 336-341

¹⁸ A. U. Newlaczky, L. G. Lu *Cancer Lett.* **2011**, 313, 123-128

B. L'APN est une aminopeptidase

Les enzymes sont dénommées selon les réactions chimiques qu'elles catalysent et suivent une classification numérique EC (*Enzyme Commission numbers*) (Figure 3).¹⁹

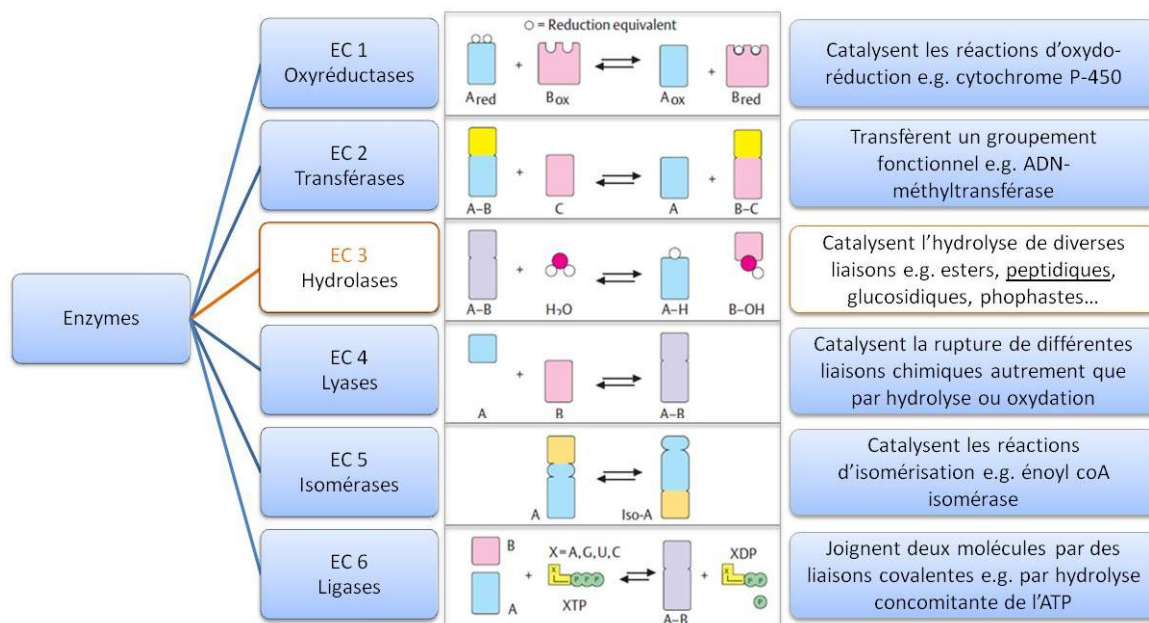


Figure 3 : Classification des familles d'enzymes selon le type de réaction qu'elles catalysent.¹⁹

L'APN ou Aminopeptidase Neutre, également notée EC 3.4.11.2, appartient à une importante classe d'enzymes - les hydrolases - représentant près de 60 % des enzymes du vivant (Figure 4).²⁰

¹⁹ <http://www.namrata.co/classification-of-enzymes/> consulté le 5 juillet 2013

²⁰ J. E. Puskas, K. S. Seo, M. Y. Sen *Eur. Polym. J.* **2011**, 47, 524-534

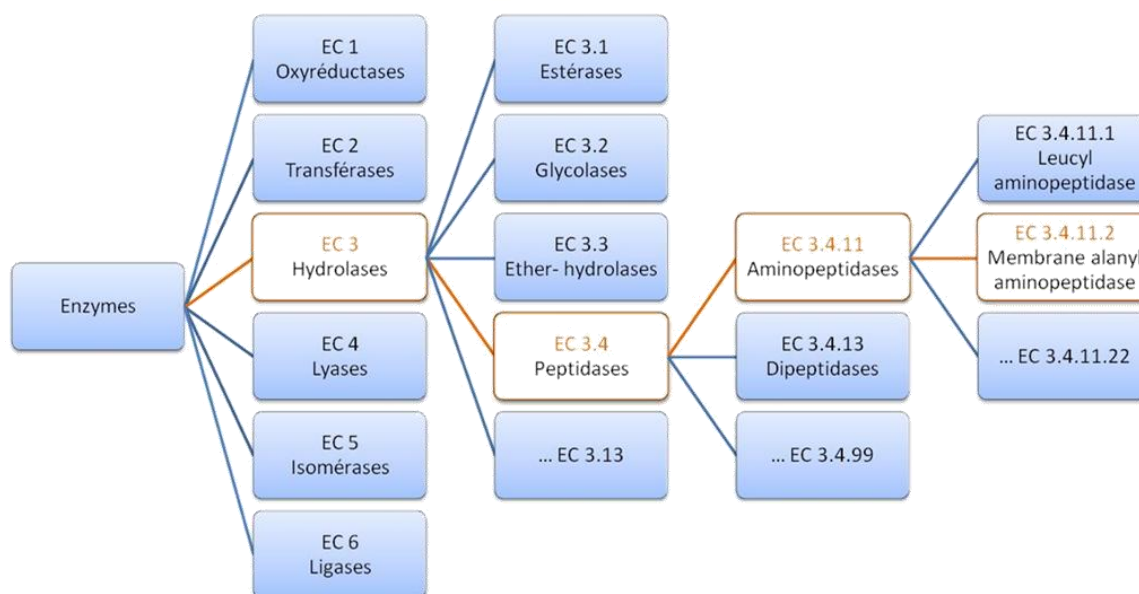


Figure 4 : Nomenclature des enzymes par famille selon la classification numérique EC (*Enzyme Commission numbers*).

L'APN catalyse la réaction d'hydrolyse d'un α -amino acide de préférence neutre, en position *N*-terminale d'un peptide ou d'une protéine. Elle est, de ce fait, également qualifiée d'exopeptidase (Figure 5).²¹

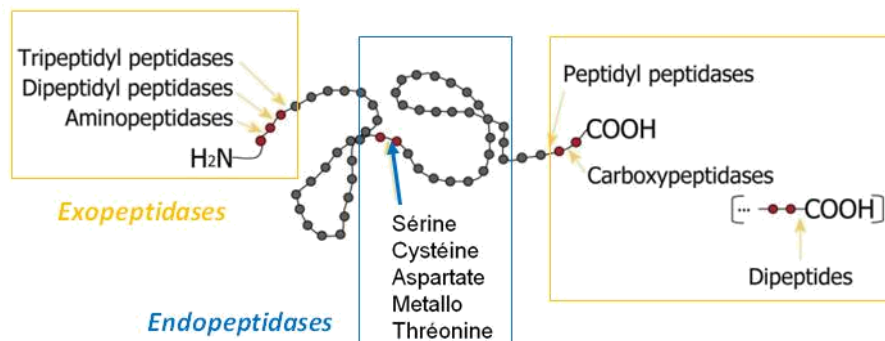


Figure 5 : Terminologie employée pour la classification des endo et exopeptidases selon leur mode d'action.²¹

Il existe, en réalité, de nombreuses autres façons de classer les enzymes. L'une d'entre elles peut reposer sur la structure même de la protéine.

²¹ A. L. Dos Santos *World J. Biol. Chem.* **2011**, 2, 48-58

C. L'APN est une ectoenzyme

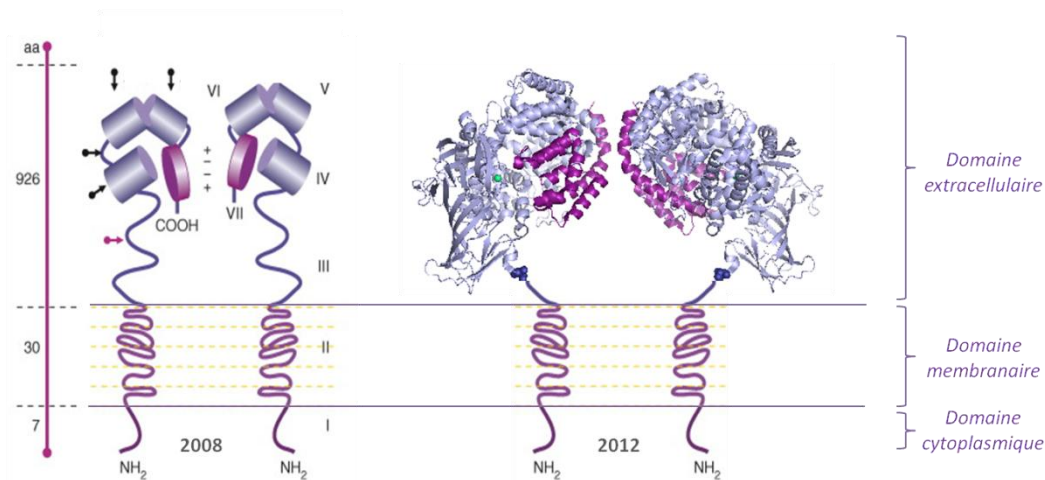
Elle est qualifiée d'ectoenzyme car le site actif de cette enzyme membranaire se situe dans un domaine extracellulaire. L'enzyme de mammifère se présente sous forme d'un homodimère dont chaque sous-unité a un poids moléculaire M_r compris entre 140 et 150 kDa selon l'espèce.¹

Alors que les structures d'APN de plusieurs espèces (*e.g.* d'*E. coli*)⁹ ont pu être résolues, il aura fallu attendre août 2012 pour connaître la structure de l'APN humaine¹⁰ et septembre 2012 pour celle de l'APN de porc.²² Leur forte glycosylation (près de 20 % de sa masse) rend, parmi d'autres facteurs, leur purification et leur cristallisation difficiles. L'APN humaine, en tant que cible de choix étudiée au laboratoire, a fait l'objet de nombreuses années d'investigations par le Dr Céline Schmitt,²³ pour la cloner, la purifier et la cristalliser. Alors que notre équipe avait enfin réussi à produire et à purifier la protéine humaine, c'est finalement une équipe canadienne qui a su optimiser les conditions pour sa cristallisation et a eu le privilège de résoudre sa structure.¹⁰

²² G. Kochan, T. Krojer, D. Harvey, R. Fischer, L. Chen, M. Vollmar, F. Von Delft, K. L. Kavanagh, M. A. Brown, P. Bowness, P. Wordsworth, B. M. Kessler, U. Oppermann *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 7745-7750

²³ Thèse de doctorat : Dr Céline Schmitt *Expression, purification et cristallisation de l'Aminopeptidase-N humaine (APN ou CD13) ; évaluation in vitro et in vivo d'inhibiteurs sélectifs* **18 septembre 2012**, UHA

La Figure 6 illustre, à gauche, un modèle supposé de l'APN et, à droite, une représentation de sa structure cristalline (partie soluble) résolue en 2012.



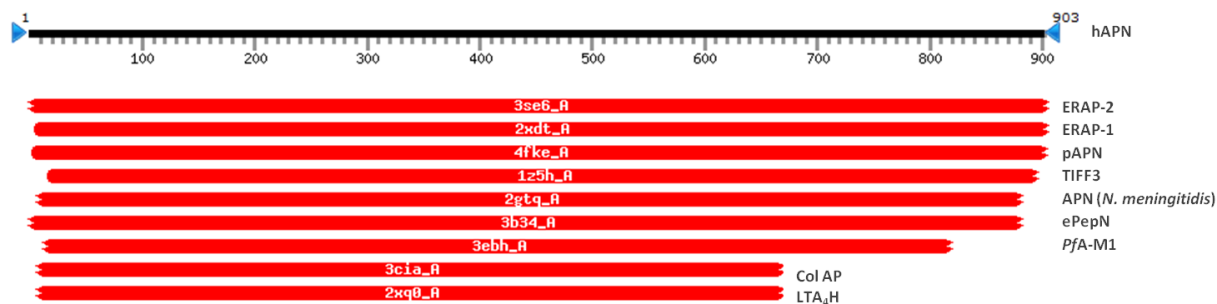
À gauche - Représentation schématique des 7 domaines structuraux de l'APN. Une échelle d'acides aminés (aa) est mentionnée pour indiquer le nombre d'aa présents dans les domaines extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire. Le site actif a été défini entre le domaine V et VI grâce à la localisation du zinc (sphères vertes) et des séquences GAMEN et HExxH de la séquence primaire. La dimérisation a lieu aux domaines VII de chaque monomère. Les sites de *N*-glycosylations sont indiqués par des flèches noires, les *O*-glycosylations par des flèches fuschia. À droite - La représentation dimère de la partie soluble (ou extracellulaire) a été réalisée à partir d'une image PyMOL avec une extension « .png » d'un monomère. Elle a pour unique but d'illustrer et de confirmer les hypothèses antérieures proposées. Les sphères vertes indiquent la position de l'ion zinc et, *a fortiori*, le domaine du site actif.

Figure 6 : Schéma hypothétique de l'APN humaine établie en 2008 et sa structure cristallographique de l'homodimère (code PDB : 4FYQ) depuis août 2012.¹⁰

Les hypothèses émises avant août 2012 sur sa structure supposée étaient très fiables car elles reposaient sur des alignements de séquences primaires de l'APN humaine (hAPN) avec des enzymes de la même famille et sur des analyses structurales résolues d'APN d'autres espèces telles que l'APN d'*E.coli* (ePepN), par exemple. Toutes ces enzymes - ERAP-2 (code PDB : 2SE6), ERAP-1 (code PDB : 2XDT), pAPN (code PDB : 4FKE), TIFF3 (code PDB : 1Z5H), ePepN (code PDB : 3B34), PfA-M1 (code PDB : 3EBH), Col AP (code PDB : 3CIA) et LTA₄H (code PDB : 2XQ0) - ont 100 % d'homologie structurale avec l'APN humaine comme le montrent les alignements proposés par HHPred (Figure 7).^{24,25}

²⁴ Programme : HHsuite-2.0.15 May 2012

²⁵ <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred/results/9729927?mode=onlySS#> consulté le 15.07.2013



Par ordre d'apparition : hAPN (APN humaine) ; ERAP-2 (Endoplasmic Reticulum Amino Peptidase 2) ; ERAP-1 (Endoplasmic Reticulum Amino Peptidase 1) ; pAPN (APN de porc) ; TIFF3 (*tricorn interacting Factor F3*) ; ePepN (APN d'*E. coli*) ; PfA-M1 (*Plasmodium falciparum* Aminopeptidase - M1) ; Col AP (*Cold active Amino Peptidase*) ; LTA₄H (*Leukotriène A₄ Hydrolase*)

Figure 7 : Indentification d'homologues structuraux à l'aide du logiciel HHpred. La séquence protéique de hAPN (noir) est comparée à l'ensemble des séquences des structures répertoriées dans la PDB. Seules les protéines pour lesquelles la probabilité d'homologie structurale est de 100 % sont représentées (rouge).^{24,25}

En plus d'être très similaires, toutes ces enzymes ont un point commun : elles contiennent au moins 1 atome de zinc dans leur site actif et sont ainsi qualifiées de métalloprotéases.


D. L'APN est une métalloprotéase

Les métalloprotéases comportent un ou plusieurs cations métalliques dans leur site actif, essentiels à la catalyse, généralement le zinc (Zn^{2+}). Plusieurs classifications des métalloprotéases sont admises. Il est possible, par exemple, de les classer en fonction du nombre de métaux qu'elles renferment et de la nature de la sphère de coordination associée (Tableau 1).¹

1 ion métallique	2 ions métalliques
Zn, Co, Mn, Ni, Cu	Homo-bimétallique (Zn,Zn ...) et Hétéro-bimétallique (Zn,Co ...) action co-catalytique
9 classes	5 classes
MA : His-Glu-Xaa-Xaa-His	MF, MG, MH, MN, MQ
MC, MD, ME, MJ, MM, MO, MP et MT	

Tableau 1 : Les différentes classes de métalloprotéases selon le nombre de métaux dans la sphère de coordination.¹

L'APN appartient au groupe MA et à la famille M1 (Tableau 2), possédant un ion zinc dans son site catalytique.



Groupe	Famille	Type d'enzyme (1 exemple par famille)
MA	M1	aminopeptidase N (<i>Homo sapiens</i>)
	M2	angiotensin-converting enzyme peptidase unit 1 (<i>Homo sapiens</i>)
	M3	thimet oligopeptidase (<i>Rattus norvegicus</i>)
	M4	thermolysin (<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>)
	M5	mycolysin (<i>Streptomyces cacaoi</i>)
	M6	immune inhibitor A peptidase (<i>Bacillus thuringiensis</i>)
	M7	snopalysin (<i>Streptomyces lividans</i>)
	M8	leishmanolysin (<i>Leishmania major</i>)
	M9	bacterial collagenase V (<i>Vibrio alginolyticus</i>)
	M10	matrix metallopeptidase-1 (<i>Homo sapiens</i>)
	M11	gametolysin (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)
	M12	astacin (<i>Astacus astacus</i>)
	M13	neprilysin (<i>Homo sapiens</i>)
	M26	IgA1-specific metallopeptidase (<i>Streptococcus sanguinis</i>)
	M27	tentoxilysin (<i>Clostridium tetani</i>)
	M30	hyicolysin (<i>Staphylococcus hyicus</i>)
	M32	carboxypeptidase Taq (<i>Thermus aquaticus</i>)
	M34	anthrax lethal factor (<i>Bacillus anthracis</i>)
	M35	deuterolysin (<i>Aspergillus flavus</i>)
	M36	fungolysin (<i>Aspergillus fumigatus</i>)
	M41	FtsH peptidase (<i>Escherichia coli</i>)
	M43	cytophagolysin (<i>Cytophaga sp.</i>)
	M48	Ste24 peptidase (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	M49	dipeptidyl-peptidase III (<i>Rattus norvegicus</i>)
	M54	archaeolysin (<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>)
	M56	BlaR1 peptidase (<i>Staphylococcus aureus</i>)
	M57	prtB g.p. (<i>Myxococcus xanthus</i>)
	M60	enhancin (Lymantria dispar nucleopolyhedrovirus)
	M61	glycyl aminopeptidase (<i>Sphingomonas capsulata</i>)
	M64	IgA peptidase (<i>Clostridium ramosum</i>)
	M66	StcE peptidase (<i>Escherichia coli</i>)
	M72	peptidyl-Asp metallopeptidase (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
	M76	Atp23 peptidase (<i>Homo sapiens</i>)
	M78	ImmA peptidase (<i>Bacillus subtilis</i>)
	M80	Wss1 peptidase (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	M84	mpriBi peptidase (<i>Bacillus intermedius</i>)
	M85	NleC peptidase (<i>Escherichia coli</i>)
	M90	MtfA peptidase (<i>Escherichia coli</i>)
	M91	NleD peptidase (<i>Escherichia coli</i>)
MC	M14	carboxypeptidase A1 (<i>Homo sapiens</i>)
	M86	PghP gamma-polyglutamate hydrolase (<i>Bacillus phage phiNIT1</i>)
MD	M15	zinc D-Ala-D-Ala carboxypeptidase (<i>Streptomyces albus</i>)
	M74	murein endopeptidase (<i>Escherichia coli</i>)
ME	M16	pitrilysin (<i>Escherichia coli</i>)
	M44	pox virus metallopeptidase (<i>Vaccinia virus</i>)
MF	M17	leucyl aminopeptidase (<i>Bos taurus</i>)
MG	M24	methionyl aminopeptidase 1 (<i>Escherichia coli</i>)
MH	M18	aminopeptidase I (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	M20	glutamate carboxypeptidase (<i>Pseudomonas sp.</i>)
	M28	aminopeptidase S (<i>Streptomyces griseus</i>)
	M42	glutamyl aminopeptidase (<i>Lactococcus lactis</i>)
MJ	M19	membrane dipeptidase (<i>Homo sapiens</i>)
	M38	isoaspartyl dipeptidase (<i>Escherichia coli</i>)
MM	M50	S2P peptidase (<i>Homo sapiens</i>)
MN	M55	D-aminopeptidase DppA (<i>Bacillus subtilis</i>)
MO	M23	beta-lytic metallopeptidase (<i>Achromobacter lyticus</i>)
MP	M67	PSMD14 peptidase (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
MQ	M29	aminopeptidase T (<i>Thermus aquaticus</i>)
MT	M81	microcystinase MlrC (<i>Sphingomonas sp. ACM-3962</i>)

Tableau 2 : Les groupes et les familles des métalloprotéases.²⁶²⁶ http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/clan_index?type=P consulté le 08.07.2013

Chaque groupe est subdivisé en plusieurs familles selon leur homologie structurale, les ligands des ions métalliques dans le site actif et leur spécificité de substrat (aminopeptidases, carboxypeptidases, ...).

Au sein des métalloprotéases à un ion zinc, l'attaque nucléophile sur une liaison peptidique se fait par l'intermédiaire d'une molécule d'eau, activée par un acide glutamique (Figure 8).²⁷

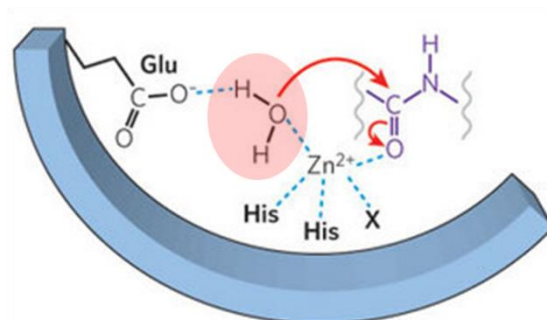


Figure 8 : Mécanisme catalytique des métalloprotéases à un ion zinc.²⁷

D'autres métaux peuvent être rencontrés tels que le cobalt, le manganèse, le nickel ou encore le cuivre.¹ Toutefois, le zinc prédomine largement dans les métalloprotéases²⁸ pour les raisons suivantes :

- Le cation Zn^{2+} possède une orbitale d remplie (d^{10}) et n'intervient pas lors de processus redox. Il est, de ce fait, très stable en milieu biologique.
- Le cation Zn^{2+} joue généralement le rôle d'acide de Lewis (lors de la réaction catalytique).
- Sa sphère de coordination est très modulable (complexe tétra, penta et hexacoordiné). Le passage d'un complexe à un autre ne nécessite qu'une faible énergie, *i.e.* seulement 0,4 kcal/mol suffit pour passer d'un complexe tétra à un complexe hexacoordiné.²⁹

La sphère de coordination de l'ion métallique est très similaire pour tout le groupe MA : His-Glu-Xaa-Xaa-His (autrement noté HExxH selon le code à une lettre des acides aminés, cf. Annexe 2). Ceci est également valable au sein d'une même famille (M1) - les acides aminés essentiels à la catalyse sont très conservés (Figure 9, légende en Annexe 3).

²⁷ E. Erez, D. Fass, E. Bibi *Nature* **2009**, 459, 371-378

²⁸ W. N. Lipscomb, N. Strater *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2375-2433

²⁹ U. Lendeckel, T. Kahne, D. Riemann, K. Neubert, M. Arndt, D. Reinold *Adv. Exp. Med. Biol.* **2000**, 477, 1-24

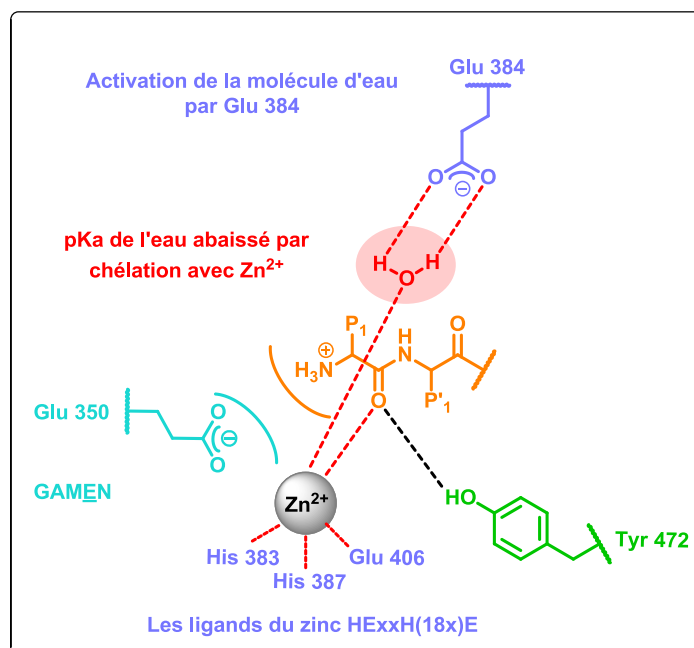


Figure 9 : Schéma du site catalytique conservé des enzymes de la famille M1 - la numérotation de l'APN porcine est utilisée ici (code PDB : 4FKE).

- Les 3 ligands du zinc sont toujours : 2 histidines H (His) et 1 acide glutamique E (Glu) selon l'enchaînement HExxH(18x)E dans la séquence primaire.
- La molécule d'eau est toujours activée par le carboxylate d'un acide glutamique E (HExxH(18x)E).
- Le site de liaison de l'amine libre de la position N-terminale de la chaîne peptidique suit toujours la séquence Gly-Ala-Met-Glu-Asn (noté GAMEN ou GXMEN - variation possible du deuxième acide aminé) - l'amine étant lié à l'acide glutamique E de cette séquence.

Ces homologues de séquence, très conservées, ont pu être observées en superposant les séquences protéiques d'aminopeptidases, au sein d'une même famille. Divers services en ligne sont mis à la disposition de l'utilisateur pour générer ces superpositions. La banque de données UniProt nous renseigne, après alignement, sur les informations suivantes :

- % d'identité : l'enchaînement et la nature des acides aminés sont rigoureusement identiques sur tout ou partie de la séquence protéique
- % d'homologie : les séquences peptidiques sont semblables bien que les acides aminés ne soient pas rigoureusement identiques ; mais proches telles que la leucine et l'isoleucine

A titre d'exemple, cette superposition a été générée à partir de l'APN de plusieurs espèces *e.g.* humaine (code PDB : 4FYQ),¹⁰ porcine (code PDB : 4FKE)³⁰ et d'*E. coli* (code PDB : 2DQM) 9 et d'autres protéines de la famille M1 : ERAP-1 (code PDB : 2YD0),³¹ LTA₄H (code PDB : 1SQM)³² et PfA-M1 (code PDB : 3EBG)³³ (Figure 10).



Par ordre d'apparition : hAPN (APN humaine) ; pAPN (APN de porc) ; ePepN (APN d'*E. coli*) ; ERAP-1 (Endoplasmic Reticulum Amino Peptidase 1) ; LTA₄H (Leukotriène A₄ Hydrolase) ; PfA-M1 (*Plasmodium falciparum* Aminopeptidase - M1)

Figure 10 : Alignement de séquence primaire de l'APN humaine avec l'APN porcine, l'APN d'*E. coli*, ERAP-1, LTA₄H et PfA-M1 appartenant à la famille M1, et les acides aminés et motifs essentiels au sein du site actif.³⁴

Le mécanisme d'hydrolyse de la liaison peptidique est commun à toute la famille M1, il n'est donc pas étonnant que le site actif reste extrêmement conservé, bien qu'il y ait environ 30 % d'homologie de séquence primaire entre ces différentes enzymes.³⁴

La Figure 8 présente le mécanisme catalytique de l'hydrolyse d'une liaison amide proposé pour les métalloprotéases à un ion zinc.²⁷ Toutefois, quelques spécificités sont propres à

³⁰ L. Chen, Y.-L. Lin, G. Peng, F. Li *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, 17966-17971

³¹ G. Kochan, T. Krojer, D. Harvey, R. Fischer, L. Chen, M. Vollmar, F. Von Delft, K. L. Kavanagh, M. A. Brown, P. Bowness, P. Wordsworth, B. M. Kessler, U. Oppermann *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 7745-7750

³² P. C. Rudberg, F. O. T. Tholander, M. Andberg, M. M. G. M. Thunnissen *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 27376-27382

³³ S. McGowan, C. J. Porter, J. Lowther, C. M. Stack, S. J. Golding, T. S. Skinner-Adams, K. R. Trenholme, F. Teuscher, S. M. Donnelly, J. Grembecka, A. Mucha, P. Kafarski, R. Degori, A. M. Buckle, D. L. Gardiner, J. C. Whisstock, J. P. Dalton *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 2537-2542

³⁴ <http://www.uniprot.org/align/2013071540KQD5AJQM> consulté le 10.07.2013

chaque famille enzyme de cette grande famille. La Figure 11 propose un mécanisme d'action utilisant la numérotation de l'APN porcine (code PDB : 4FKE).

Dans le site actif de l'enzyme native, la molécule d'eau nécessaire à l'hydrolyse est liée à l'atome de zinc ainsi qu'à un résidu Glu : l'ion zinc est tétracoordiné. Dès lors qu'un peptide se lie au site actif, le zinc devient pentacoordiné : le carbonyle de la fonction amide est activé par le zinc ; le complexe de Michaelis est ainsi formé (Figure 11a, légende en Annexe 3). Le résidu Tyr, également essentiel à la catalyse, établit une liaison hydrogène avec le carbonyle de la fonction amide. La molécule d'eau est activée à la fois par l'action acide de Lewis du zinc et par le carboxylate du résidu Glu. Le pKa de la molécule d'eau avoisine la valeur de 6³⁵ : il y a alors formation, *in situ*, d'un groupement hydroxyle HO⁻. L'attaque nucléophile de ce dernier est alors plausible sur la fonction carbonyle de l'amide. Le résidu Glu, activant la molécule d'eau, joue le rôle de navette à proton (équivalente à une prototropie) : l'azote de la fonction amide est alors protonée (Figure 11b, légende en Annexe 3) et ce transfert correspond, de manière plus générale, à un mécanisme de type catalyse acide-base. L'étape clé de ce mécanisme est la formation de l'intermédiaire tétraédrique (Figure 11c, légende en Annexe 3), stabilisé par le réseau de liaisons hydrogènes et d'interactions électrostatiques – dénommés ponts salins - établis par les acides aminés environnants. S'en suit, finalement, une rupture de la liaison peptidique pour donner lieu aux produits de la réaction (Figure 11d, légende en Annexe 3).

³⁵ B. W. Matthews *Acc. Chem. Res.* **1988**, 21, 333

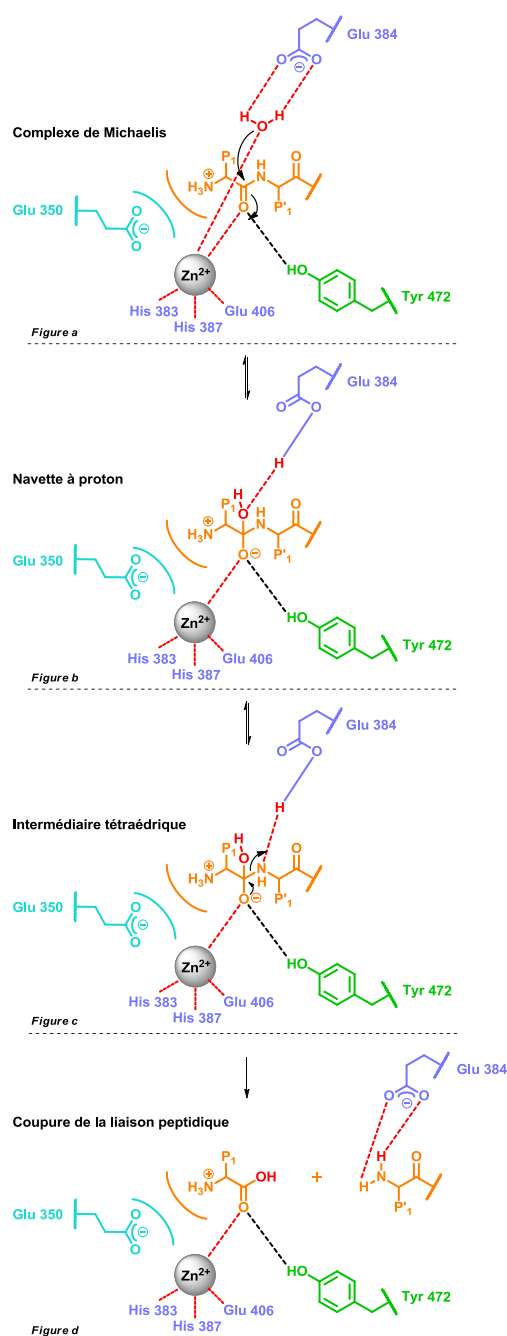


Figure 11 : Mécanisme catalytique proposé pour l'hydrolyse de la liaison peptidique - la numérotation de l'APN porcine est utilisée ici (code PDB : 4FKE).³⁶

Il est important de noter, à ce stade, que la formation de cet intermédiaire tétraédrique est capital car il est celui qui a le plus d'affinité pour l'enzyme. Une conception rationnelle d'inhibiteurs devrait alors mimer cet intermédiaire.

³⁶ A. Fersht, In Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding ; W. H. Freeman and Company: New York, **1999**, p. 54

II. Les inhibiteurs de l'APN et leurs modes de liaison

Depuis les années 90, l'APN suscite un intérêt grandissant en chimie médicinale. A ce jour, pas moins d'un millier de publications ont vu le jour dans des journaux traitant de chimie thérapeutique notamment. Bien que l'intérêt de cette enzyme devienne important, peu d'inhibiteurs sélectifs sont décrits à ce jour.^{37,38} Nous disposons néanmoins de résultats structuraux qui nous permettent de mieux comprendre les interactions protéine-ligand.

Les travaux sur l'APN ont débuté avec la bestatine, inhibiteur le plus décrit, qui est un composé naturel isolé à partir de la bactérie *Streptomyces olivoreticuli*.³⁹ Ils ont permis, grâce à la cristallographie par rayons X de complexes enzyme-substrat, de mettre en lumière les interactions moléculaires existant entre l'enzyme et le ligand (Annexe 4).

Dans un premier temps, seront donc décrites les interactions entre les APN de plusieurs espèces et la bestatine. Puis, la compréhension de celles-ci permettra, dans un deuxième temps, de mieux définir celles générées par l'inhibiteur le plus puissant de l'APN synthétisé à ce jour au laboratoire. Une discussion sera apportée concernant les valeurs de K_i des ligands *i.e.* bestatine et **1a** induites par ces interactions.

A. Les complexes APN - bestatine

Avant de s'intéresser à l'APN humaine, l'analyse cristallographique va principalement porter sur l'APN d'*E. coli*. Contrairement à l'APN humaine qui à ce jour, n'a fait l'objet que d'une seule publication,¹⁰ les APN de bactéries et d'archéobactéries ont pu être plus amplement étudiées car elles présentent des conditions de clonage, de purification et de cristallisation plus aisées à mettre en œuvre.^{9,32,33}

1. Complexe APN *E. coli* - bestatine⁹

Afin de bien comprendre la nature des interactions « protéine - ligand », il est judicieux d'étudier l'enzyme sous sa forme native (Figure 12A, légende en Annexe 3). L'analyse cristallographique de l'APN d'*E. coli* (code PDB : 2DQ6) nous révèle les acteurs primordiaux

³⁷ A. Mucha, M. Drag, J. P. Dalton, P. Kafarski *Biochimie* **2010**, 92, 1509-1529

³⁸ F. E. Jacobsen, J. A. Lewis, S. M. Cohen *Chem. Med. Chem.* **2007**, 2, 152-171

³⁹ H. Umezawa, M. Ishizuka, T. Aoyagi, T. Takeuchi *J. Antibiot. (Tokyo)* **1976**, 29, 857-859

du site actif : le zinc tétracoordiné, sa sphère de coordination (HExxH(18x)H) et la molécule d'eau catalytique.

Dès lors que l'on s'intéresse au complexe APN - bestatine (code PDB : 2DQM) (Figure 12B, légende en Annexe 3), on constate que le groupement hydroxyle du ligand remplace la molécule d'eau catalytique et coordine le zinc avec des longueurs de liaisons quasi identiques. Dans ce cas de figure, ce dernier est non pas tétra mais pentacoordiné : le carbonyle du groupement amide de la bestatine se lie également au zinc à une distance de 2,8 Å. Les acides aminés, compris dans la sphère de coordination du zinc, complexent le ligand : le carboxylate du résidu Glu 298 d'une part, et celui du résidu Glu 320 d'autre part, à des distances respectives de 2,6 et 3,1 Å.

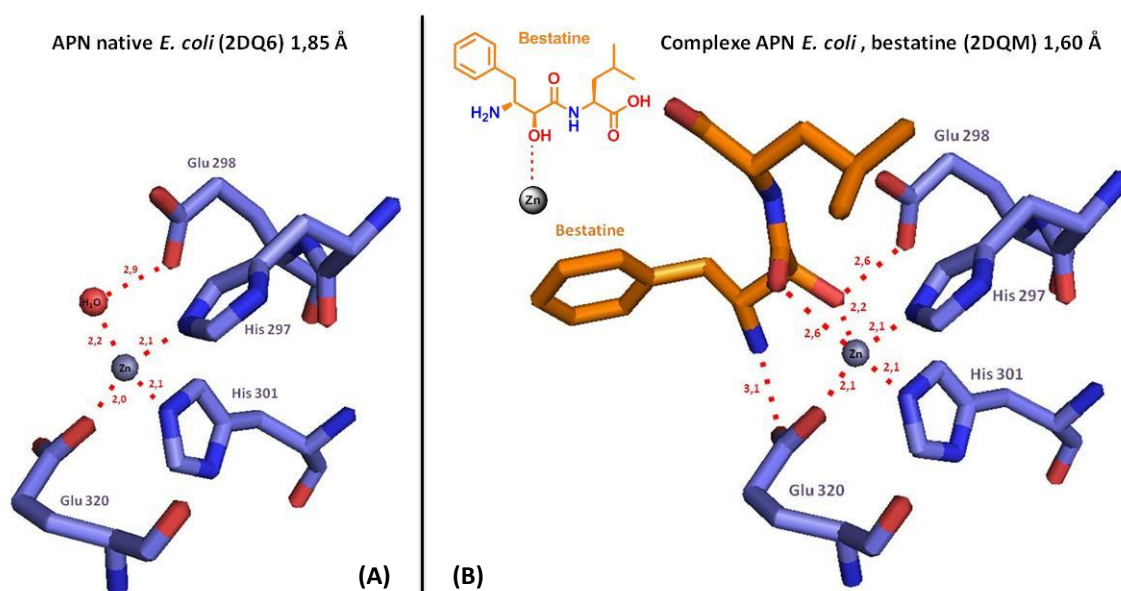
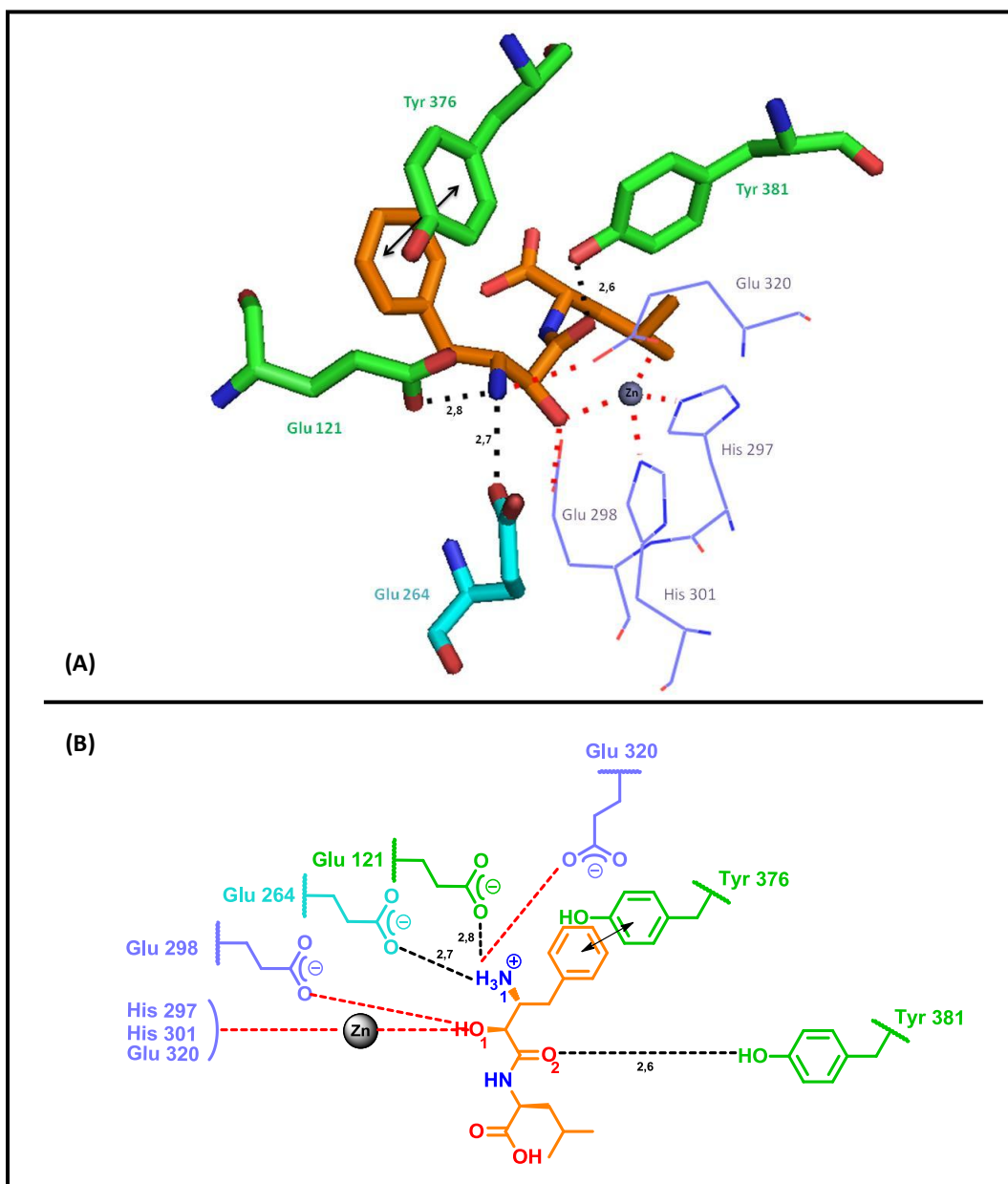


Figure 12 : Représentations du motif HExxH(18x)E dans l'APN native d'*E. coli* (A) et dans le complexe APN *E. coli*-bestatine (B) - valeur des distances en Å.⁹

La constante d'inhibition de l'ordre du micromolaire ($IC_{50} = 4,1 \mu M$) s'explique par l'ensemble des interactions entre l'APN d'*E. coli* et la bestatine présenté Figure 13 (légende en Annexe 3) :

- Les résidus Glu 264 du motif GAMEN et Glu 121, stabilisent le complexe grâce à une liaison ionique, également nommée pont salin, entre son carboxylate et l'ammonium primaire de la bestatine.
- Le résidu Tyr 381, au même titre que les motifs HExxH(18x)H et GAMEN, est un résidu très conservé. Il établit une liaison hydrogène avec le carbonyle de la fonction amide du substrat et stabilise l'état de transition.

- Le résidu Tyr 376 établit, quant à lui, une interaction de type « π -stacking, parallel displaced » avec le noyau aromatique de la bestatine (Annexe 4). Ce résidu se situe à une distance d'environ 4 Å (flèche noire).



Conditions de cristallisation : tampon {Tris.HCl (20 nM)}, solvant {(NH₄)₂SO₄ (2,2 M) ; tampon MES (100 mM)}, pH 6,4, [enzyme] = 283 μ M, [bestatine] = 1 mM, IC₅₀ = 4,1 μ M

Figure 13 : Représentations 3D (A) et 2D (B) des principaux résidus impliqués dans les interactions du complexe APN *E. coli*-bestatine (code PDB : 2DQM) – valeur des distances en Å.⁹

2. Complexe APN porcine - bestatine ³⁰

L'étude des structures cristallographiques sur l'APN de porc (Figure 14, légende en Annexe 3) confirme que, les acides aminés de la sphère de coordination du zinc sont non seulement

identiques mais occupent une position, dans le site actif, équivalente à ceux de l'APN d'*E. coli*.

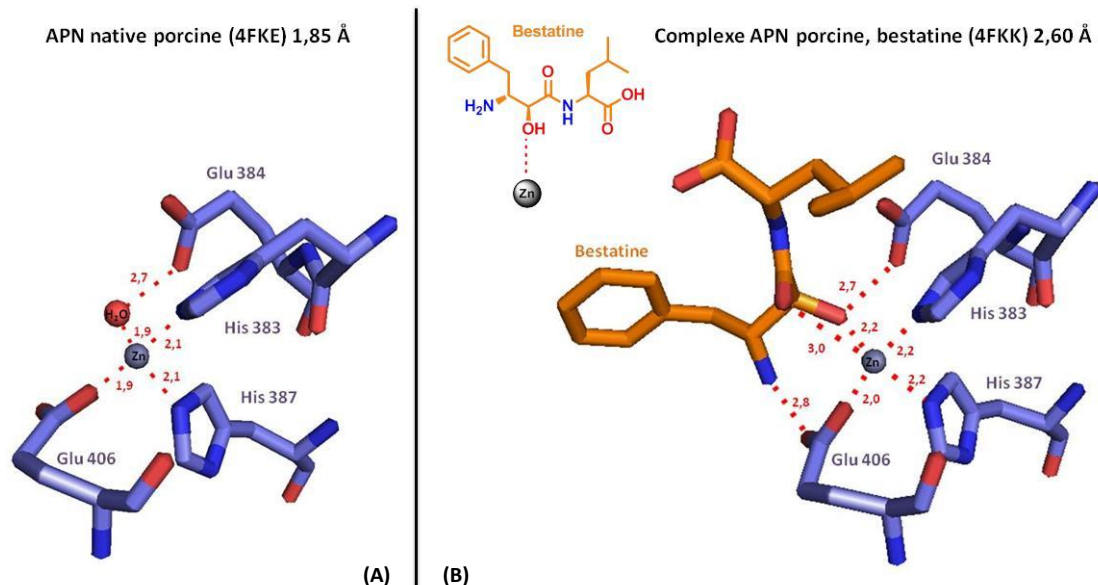
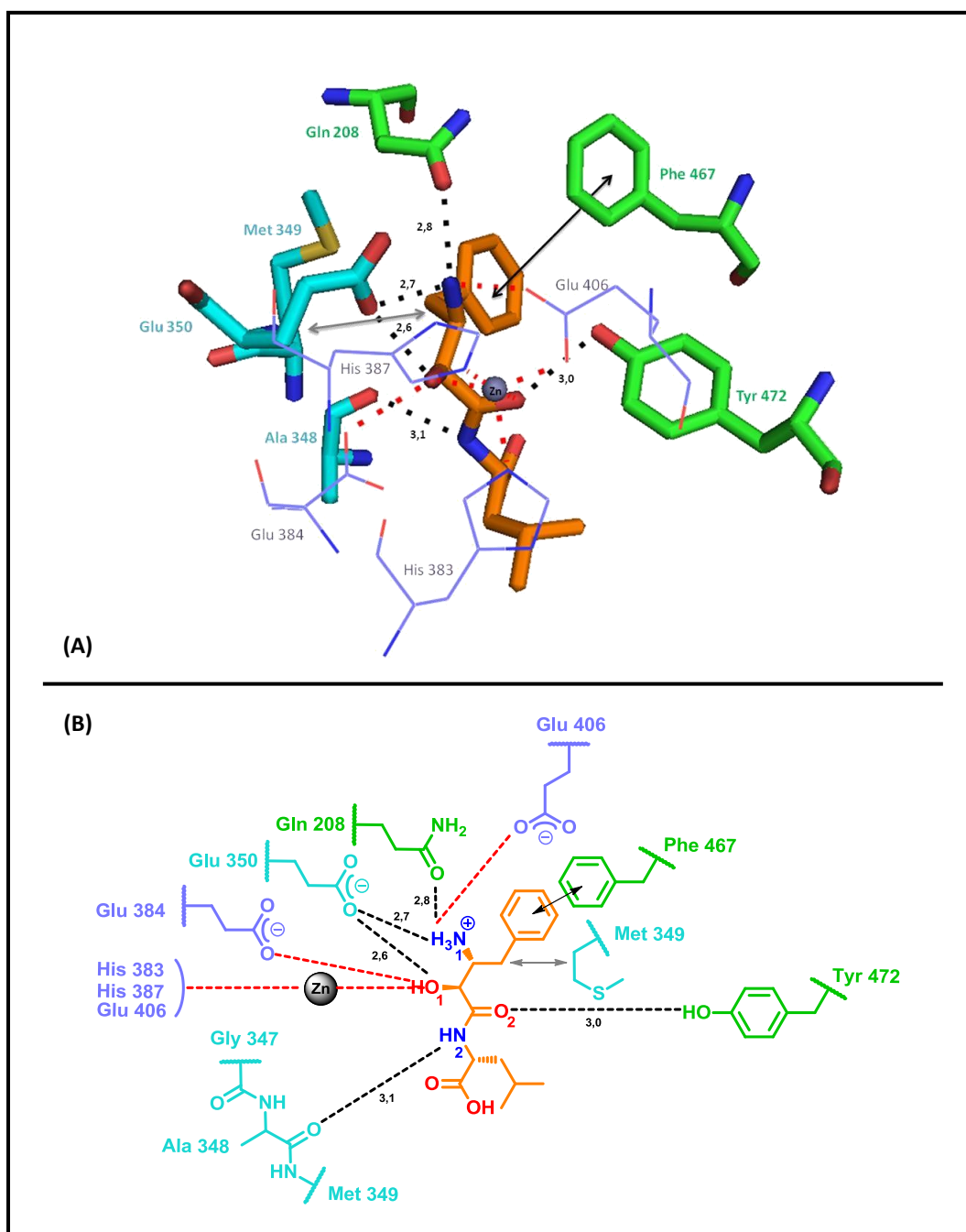


Figure 14 : Représentations du motif HExxH(18x)E dans l'APN native porcine (A) et dans le complexe APN de porc-bestatine (B) – valeur des distances en Å.³⁰

Les interactions mises en jeu sont de même nature que dans le cas de l'APN d'*E. coli*. Toutefois, quelques spécificités, propres à l'APN porcine, sont à ajouter (Figure 15A et B, légende en Annexe 3) :

- Se situant à une distance raisonnable de 2,8 Å, le résidu Gln 208 établit un pont salin entre son carbonyle de la fonction amide et l'ammonium primaire de la bestatine.
- Le résidu Met 349, appartenant lui aussi à la séquence GAMEN, effectue une interaction de type hydrophobe entre sa chaîne latérale et le CH₂ en position benzylique du ligand (flèche grisée).
- Le résidu Ala 348, inclus également dans la poche GAMEN, établit une liaison hydrogène entre le carbonyle de sa fonction amide et l'amide de la bestatine.



Conditions de cristallisation : tampon {Tris.HCl (20 mM) ; NaCl (200 mM)}, solvant {EG 20 % ; PEG3350 25 % ; LiSO₄ (200 mM) ; Hepes (100 mM)}, pH 7,2, [enzyme] = 94,6 μM, [bestatine] = 5 mM, IC₅₀ = 3,5 μM

Figure 15 : Représentations 3D (A) et 2D (B) des principaux résidus impliqués dans les interactions du complexe APN porcine-bestatine – valeur des distances en Å.³⁰

Du fait de la similitude, décrite précédemment, des sites actifs de l'APN de porc et d'*E. coli*, les distances des différentes interactions mises en jeu sont du même ordre de grandeur (Tableau 3).

atome ou groupement impliqué dans une interaction protéine-ligand	APN porcine		APN <i>E. coli</i>	
	résidu	distance (Å)	résidu	distance (Å)
Zn^a	His 383	2,2	His 297	2,1
	His 387	2,2	His 301	2,1
	Glu 406	2,0	Glu 320	2,1
O₁^b	Zn ^a	2,7	Zn ^a	2,6
	Glu 384	2,6	Glu 298	2,1
	Glu 350	2,2	-	-
N₁^b	Glu 406	2,8	Glu 320	3,1
	Glu 350	2,7	Glu 264	2,7
	Gln 208	2,8	Glu 121	2,8
O₂^b	Zn ^a	3,0	Zn ^a	2,6
	Tyr 472	3,0	Tyr 381	2,6
N₂^b	Ala 348	3,7	-	-
Ph^b	Phe 467	≈ 4 ^c	Tyr 376	≈ 4 ^c

^a atome appartenant à l'enzyme

^b atome ou groupement appartenant à la bestatine

^c distance évaluée au moyen du logiciel PyMOL - correspond à une interaction de type « π -stacking parallel displaced » représentée par une flèche noire dans les Figure 15A et B

Tableau 3 : Principaux résidus impliqués dans les interactions entre l'APN de porc ou d'*E. coli* et la bestatine, et les distances correspondantes.

3. Complexe APN humaine - bestatine ¹⁰

L'analyse des cristaux de l'APN humaine native (code PDB : 4FYQ) (Figure 16A, légende en Annexe 3) et des complexes APN humaine-bestatine (code PDB : 4FYR) (Figure 16B, légende en Annexe 3) révèle des informations différentes de celles exposées pour les enzyme de cette famille dont la structure du complexe a été résolue *e.g.* ePepN,⁹ LTA4H,³² PfA-M1,³³ *etc.*

En analysant de plus près la Figure 16A, on s'aperçoit qu'une molécule d'acétate (provenant de NaOAc et abrégé par « Acy » en vert, cf. conditions de cristallisation en légende de la Figure 18) a probablement déplacé la molécule d'eau catalytique. La molécule « Acy » coordine doublement le zinc à des distances très raisonnables de 2,0 et 2,5 Å. En revanche, la molécule d'eau est, maintenant, à une distance de 3,7 Å du zinc (distance la plus proche observée) et la distance ainsi que l'angle formé avec le résidu Glu 389 ne sont plus adéquats.

Dans l'analyse du complexe APN-bestatine (Figure 16B), la position adoptée par l'inhibiteur, dans le site actif, est originale : généralement c'est non pas l'acide carboxylique mais le groupement hydroxyle de la bestatine qui se lie principalement au zinc du site actif de l'enzyme.

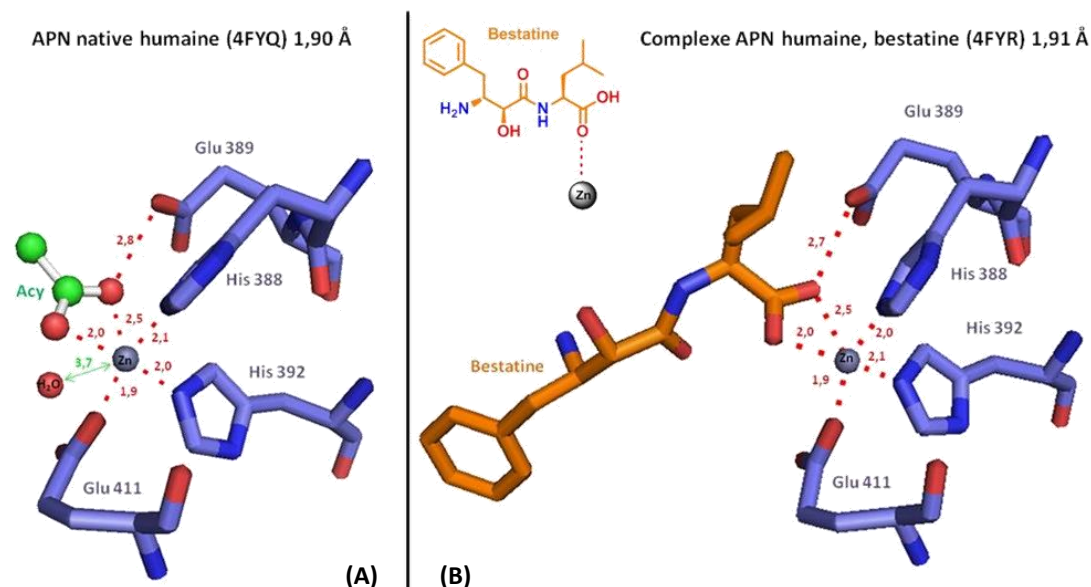


Figure 16 : Représentations du motif HExxH(18x)E dans l'APN native humaine (A) et dans le complexe APN humaine-bestatine (B) – valeur des distances en Å.¹⁰

La Figure 17 (légende en Annexe 3) rend compte de cette différence au niveau du mode de liaison au zinc.

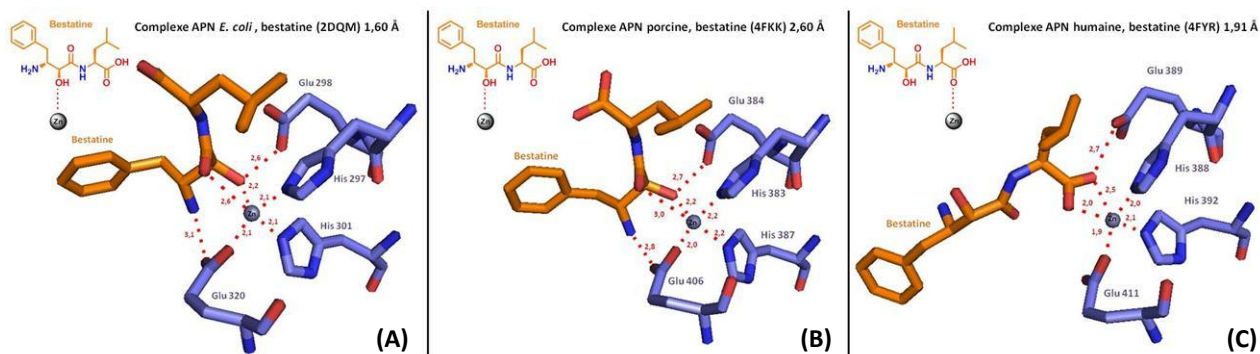


Figure 17 : Comparaison des modes de liaison de la bestatine au zinc du site actif d'*E. coli* (A), de l'APN de porc (B) et humaine (C).

Il est à noter que Wong *et al.* ont également étudié d'autres complexes tel que l'APN humaine-amastatine (code PDB : 4FYT). Bien que le mode de liaison dans le complexe APN humaine-bestatine semble inédit, celui avec l'amastatine observe un mode de liaison au zinc similaire à d'autres complexes de type APN-bestatine (Tableau 4). La structure du complexe APN humaine-bestatine demande certainement à être confirmée.

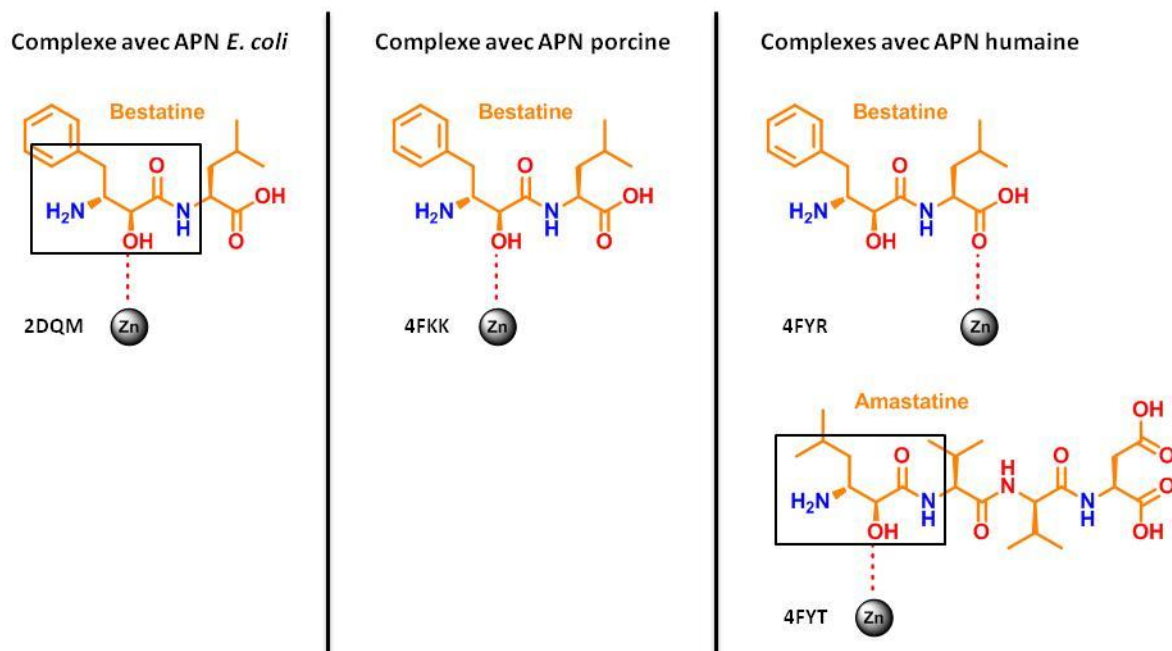
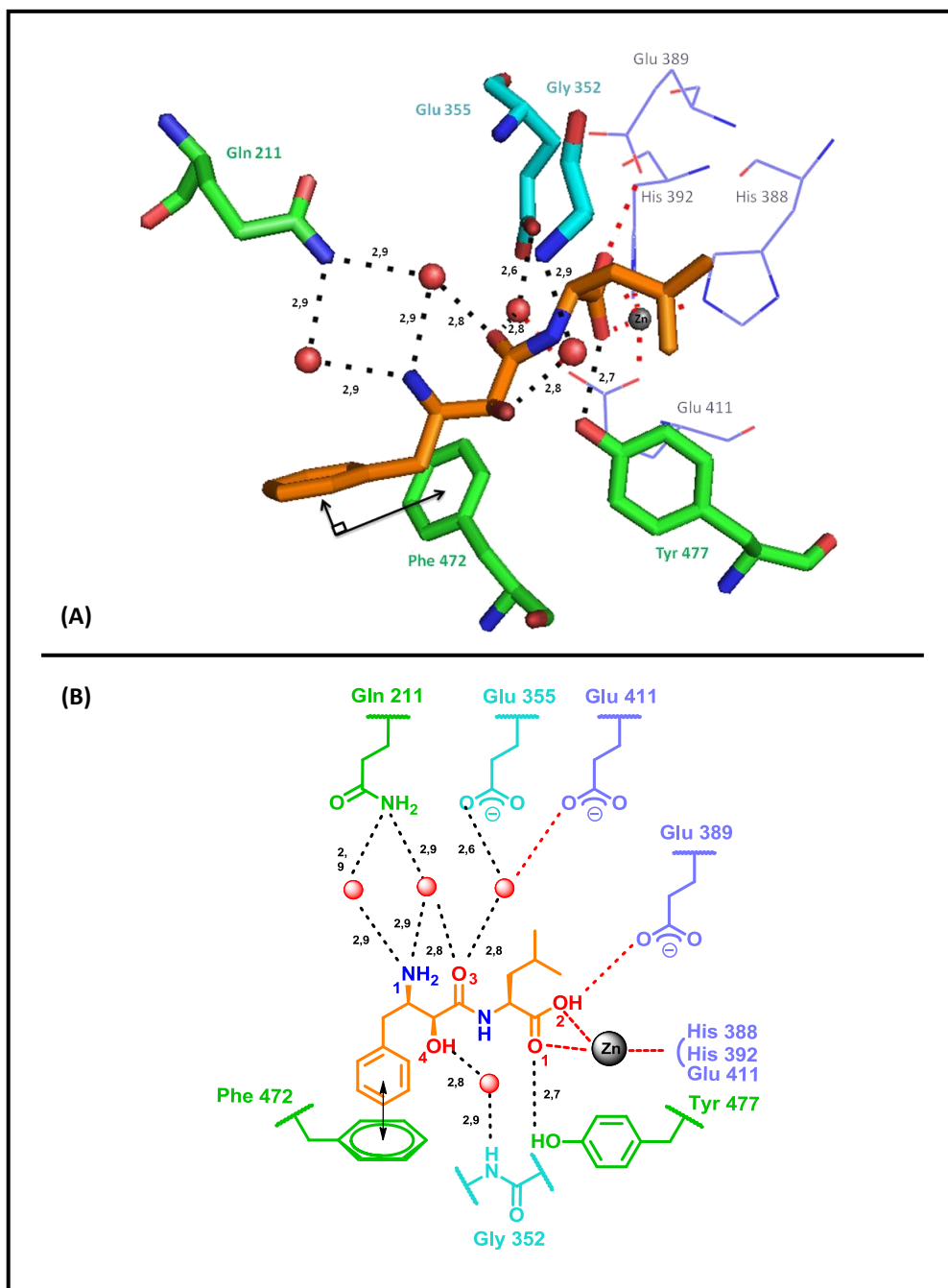


Tableau 4 : Chélation du zinc par les ligands bestatine et amastatine dans l'APN porcine, *E. coli* et humaine - l'encadré noir correspond au motif de type « statine », dont le groupement hydroxyle est généralement le principal chélatant du zinc.

Plus surprenant encore, le groupement amino de la bestatine n'est pas reconnu par le site GAMEN (résidu Glu 355). Par ailleurs, contrairement aux autres complexes décrits jusqu'à présent, la bestatine, complexée au site actif de l'APN humaine, se situe au milieu d'un réseau de molécules d'eau (Figure 18, Annexe 3).



Conditions de cristallisation : tampon {Hepes (100 nM) ; NaCl (50 mM)}, solvant {glycérol 10 % ; NaOAc (100 mM)}, pH 5, [enzyme] = 189 μ M, [bestatine] = 300 μ M, IC₅₀ = 3,5 μ M

Figure 18 : Représentations 3D (A) et 2D (B) des principaux résidus impliqués dans les interactions du complexe APN humaine-bestatine – valeur des distances en Å.¹⁰

Les interactions mises en jeu au sein de l'enzyme humaine sont comparées Tableau 5 avec celles impliquées dans l'APN porcine.

	APN humaine	APN porcine
	Zn \leftrightarrow O ₁ et O ₂ Δ_1	Zn \leftrightarrow O ₁
Séquence HExxH(18x)E	His 388 \leftrightarrow Zn	His 383 \leftrightarrow Zn
	Glu 389 \leftrightarrow O ₂ Δ_2	Glu 384 \leftrightarrow O ₁
	His 392 \leftrightarrow Zn	His 387 \leftrightarrow Zn
	Glu 411 \leftrightarrow eau \leftrightarrow O ₃ Δ_3 et \leftrightarrow Zn	Glu 406 \leftrightarrow N ₁ et \leftrightarrow Zn
Séquence GXMEN	Glu 355 \leftrightarrow eau \leftrightarrow O ₃ Δ_4	Glu 350 \leftrightarrow N ₁
	Gly 352 \leftrightarrow eau \leftrightarrow O ₄	Ala 348 \leftrightarrow N ₂
Autres résidus	Glu 211 \leftrightarrow eau x2 \leftrightarrow N ₁	Gln 208 \leftrightarrow N ₁
	Tyr 477 \leftrightarrow O ₁ Δ_5	Tyr 472 \leftrightarrow O ₂
	Tyr 472 \leftrightarrow « π -stacking edge to face » -Ph	Phe 467 \leftrightarrow « π -stacking parallel displaced » -Ph

Tableau 5 : Comparaison des principales interactions (\leftrightarrow) mises en jeu par la bestatine dans l'APN de porc et humaine, et présentation des originalités (Δ_i) observées dans le cas de l'APN humaine.

La coordination du zinc à l'acide carboxylique (Δ_1) n'est pas la seule originalité à signaler :

- De part la position adoptée par la bestatine dans le site actif, les résidus Glu 389 et 411 sont à bonne distance, respectivement, de l'acide carboxylique (Δ_2) et du carbonyle de la fonction amide (Δ_3).
- Une observation encore plus étonnante est que le résidu Glu 355 du motif GXMEN reconnaît généralement la position N-terminal d'un peptide. Or, étant donnée l'occupation singulière de la bestatine dans l'enzyme, il n'est pas surprenant que ce résidu établisse une interaction avec le ligand, ici, par l'intermédiaire d'une molécule d'eau (Δ_4).
- A toutes ces constatations s'ajoute la liaison entre l'acide carboxylique de la bestatine et le résidu Tyr 477 (Δ_5). Cependant, il a été vu précédemment que ce résidu stabilise généralement l'intermédiaire tétraédrique d'un peptide en se liant sur le carbonyle de la fonction amide. Dans les autres cas étudiés de complexes APN-bestatine (e.g. d'autres espèces), la bestatine mime cet état de transition et est donc stabilisé par ce résidu Tyr.

Les conditions de cristallisation (pH, solvant, concentration, ...) peuvent influencer sur la formation des cristaux. Il est donc possible que les conditions utilisées par Wong *et al.* soient plus originales que celles généralement employées. En effet, contrairement aux cristaux des complexes d'APN *E. coli*-bestatine et d'APN porcine-bestatine, ceux du complexe APN humaine-bestatine sont obtenus à pH acide. Par ailleurs, l'analyse des conditions de

cristallisation mentionnées dans les figures précédentes permet de mettre en lumière plusieurs points (Tableau 6).

	APN <i>E. coli</i>	APN porcine	APN humaine
[bestatine]	1 mM	5 mM	300 μ M
[enzyme]	283 μ M	95 μ M	189 μ M
[bestatine] / [enzyme]	3,5	53	1,6
pH	6,4	7,2	5

Tableau 6 : Comparaison des principales conditions de cristallisation des complexes APN-bestatine.

- Le rapport [bestatine] / [enzyme] dans le complexe APN humaine-bestatine est proche de 1 soit 33 fois moins important que dans le complexe APN porcine-bestatine.
- Alors que le pH de formation des complexes (APN *E. coli* et porcine) avoisine la valeur de 7, celle du complexe APN humaine-bestatine est étonnamment de 5 *i.e.* proche du $pI_{théorique}$ ⁴⁰ de l'APN native (5,31),⁴¹ valeur de pH la moins favorable pour la solubilisation de l'enzyme.

Enfin, compte tenu des difficultés que représentent les conditions de cristallisation, à ce jour, l'équipe investigatrice des travaux sur le complexe APN humaine-bestatine n'a pas eu la possibilité d'obtenir de nouveaux cristaux pour confirmer ou infirmer cette analyse structurale.⁴²

⁴⁰ pI : le point isoélectrique d'une protéine est défini comme étant le pH pour lequel la charge globale de cette molécule est nulle

⁴¹ <http://lifecenter.sgst.cn/dbdepc/detailProtein.do?uniprotKB=P15144> consulté le 20 octobre 2013

⁴² L'équipe du Pr Tarnus est en collaboration avec celle du Dr Rini du département de Biochimie de l'université de Toronto

B. Les complexes APN - **1a**1. Complexe APN *E. coli* - **1a**

Le Dr. Céline Schmitt a obtenu des complexes de plusieurs inhibiteurs de type amino-subérone, dont **1a**, avec l'APN d'*E. coli*⁴³ en collaboration avec le Dr Vincent Ollieric travaillant au *Swiss Light Source*.⁴⁴ Pour des raisons déjà citées auparavant (cf. p. 28), il n'a pas été possible, à ce jour, d'obtenir des co-cristaux avec des APN de mammifères. Toutefois, en raison des similitudes des différentes APN exposées précédemment, l'analyse structurale est non seulement très fiable mais révèle des informations capitales qui orienteront nos stratégies futures.

Avant même de décrire les différentes interactions mises en jeu dans le complexe APN *E. coli*-**1a**, trois informations remarquables sont à relever (Figure 19, légende en Annexe 3) :

- **1a** chélate le zinc par sa fonction cétone sous sa **forme hydratée**. Cette configuration mime, en réalité, l'intermédiaire tétraédrique formé lors de la catalyse.
- L'analyse cristallographique nous révèle aussi que seul l'**énantiomère (S)**, du mélange racémique obtenu par synthèse, se lie au site actif de l'enzyme.
- Le cycloheptane est sous sa **conformation pseudo chaise** la plus stable.

⁴³ Résultats en cours de publication

⁴⁴ Institut Paul Scherrer, 5232 Villigen PSI – Switzerland

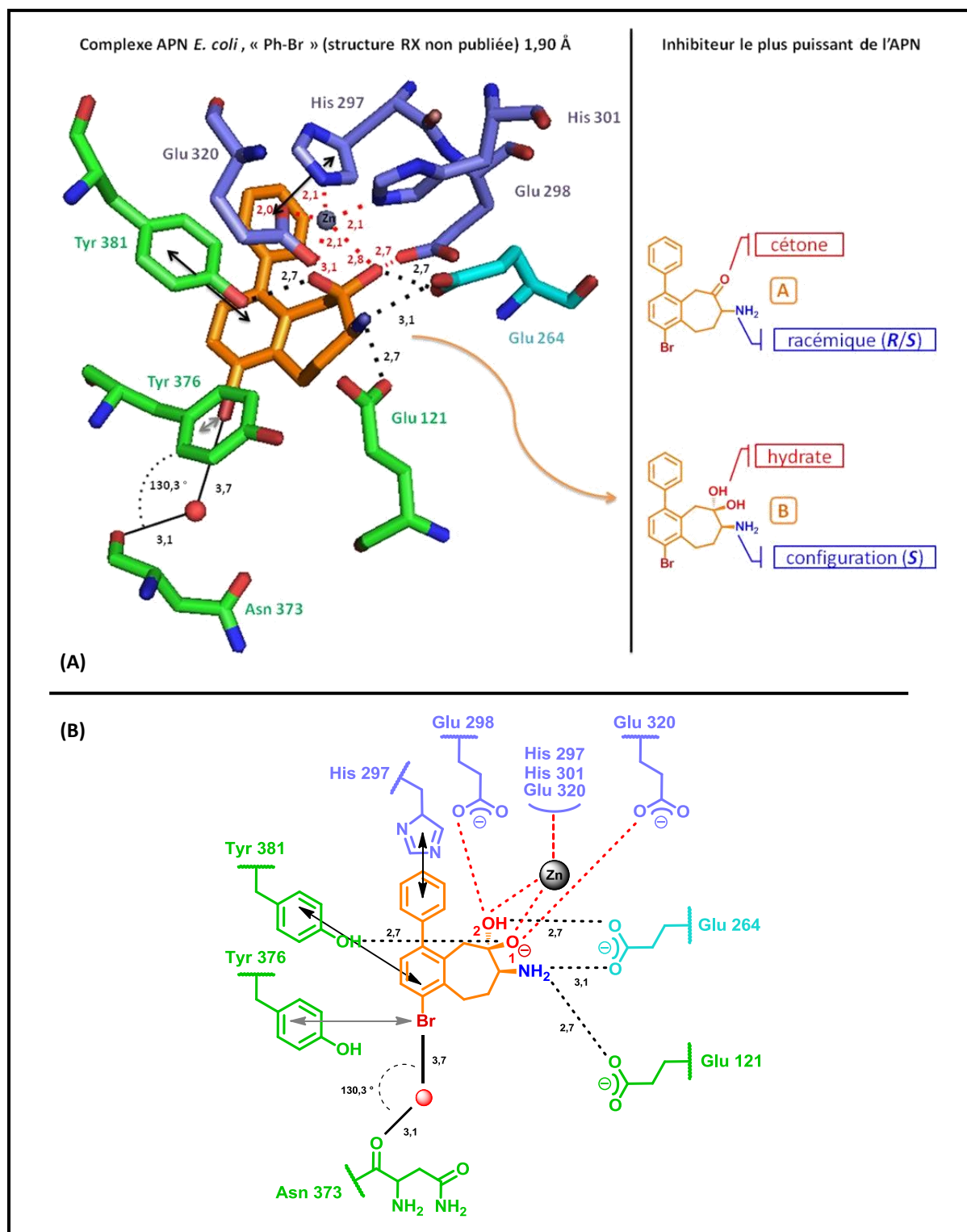


Figure 19 : Représentations 3D (A) et 2D (B) des principaux résidus impliqués dans les interactions du complexe APN *E. coli*-1a** – valeur des distances en Å.**

Il est intéressant de constater que pratiquement chaque partie de cette molécule au faible poids moléculaire établit une, voire plusieurs, interactions avec les éléments clés et

conservés du site actif (Tableau 7) ce qui explique non seulement sa très basse valeur de constante d'inhibition de 0,35 nM sur l'APN humaine, 34 nM sur l'APN *E. coli* et de 60 pM sur l'APN porcine, mais également sa très grande sélectivité pour les aminopeptidases de la famille M1.

	Interactions	Distances (Å)
Zn	Zn \leftrightarrow O ₁	2,1
	Zn \leftrightarrow O ₂	2,8
Séquence HExxH(18x)E	His 297 \leftrightarrow Zn	2,1
	His 297 \leftrightarrow « π -stacking parallel displaced » de type hybride avec -Ph	n.d.
	Glu 298 \leftrightarrow O ₂	2,7
	His 301 \leftrightarrow Zn	2,1
	Glu 320 \leftrightarrow Zn	2,0
	Glu 320 \leftrightarrow O ₁	3,1
Séquence GXMEN	Glu 264 \leftrightarrow N	3,1
	Glu 264 \leftrightarrow O ₂	2,7
Autres résidus	Glu 121 \leftrightarrow N	3,1
	Tyr 381 \leftrightarrow O ₁	2,7
	Tyr 381 \leftrightarrow « π -stacking parallel displaced » avec le noyau aromatique	nd
	Tyr 376 \leftrightarrow Br, interaction hydrophobe	3,6
	Asn 373 \leftrightarrow eau \leftrightarrow Br, interaction XWH « halogen-water-hydrogen bridge »	d ₁ = 3,7 d ₂ = 3,1 χ = 130,3 ° θ = 167 °

Tableau 7 : Liste des interactions mises en jeu, dans le complexe APN *E. coli*-1a et les distances (Å) correspondantes.

Une interaction intéressante à considérer ici, est la formation d'un pont « halogène-eau-hydrogène » entre le brome et le carbonyle du résidu Asn 373 (Figure 20).^{203,45}

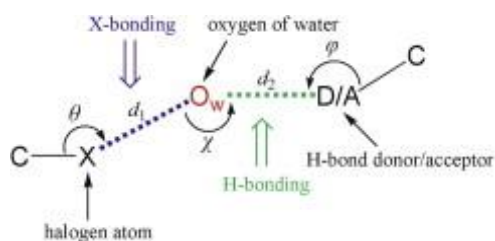


Figure 20 : Schéma général d'un pont « halogène-eau-hydrogène ».^{203,45}

⁴⁵ P. Auffinger, F. A. Hays, E. Westhof, P. S. Ho *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 16789-16794

Si sont comparés les complexes de bestatine (Figure 21A, légende en Annexe 3) et de **1a** (Figure 21B, légende en Annexe 3) avec l'APN d'*E. coli*, force est de constater que **1a** adopte une position qui s'apparente à celle de la bestatine. Les modes de liaisons sont, de ce fait, très similaires.

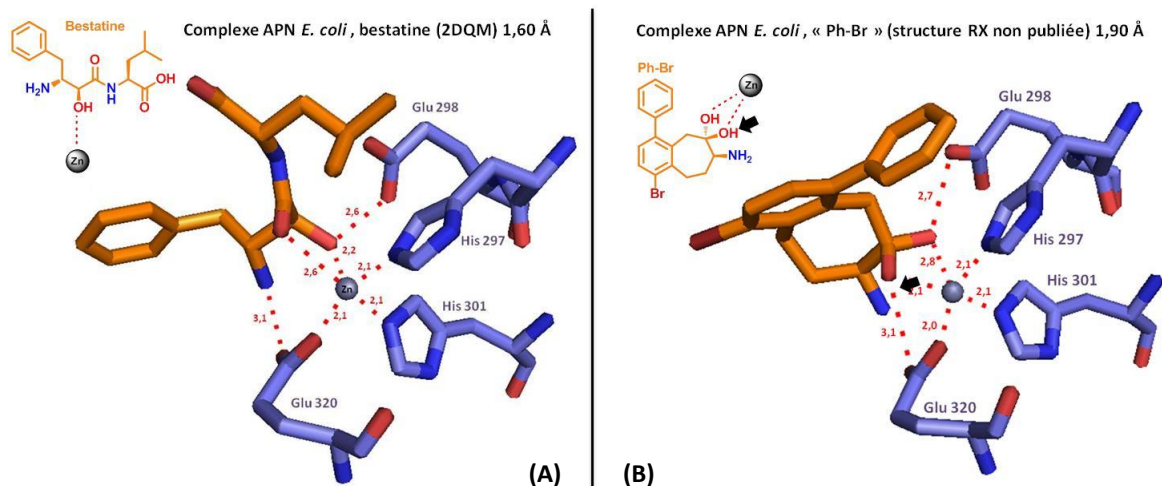


Figure 21 : Comparaison des modes de liaison de la bestatine (A) et **1a (B) dans le motif HExxH(18x)E de l'APN d'*E. coli* - valeur des distances en Å.**

La superposition de ces deux inhibiteurs dans le site actif d'*E. coli* (Figure 22A) nous permet de voir leurs positions adoptées respectives. Alors que le groupement isopropyle de la bestatine occupe la poche S'_1 du site actif (selon la nomenclature de Schechter et Berger - Figure 22B et C),⁴⁶ **1a** l'occupe avec son groupement phényle. La poche S_1 , quant à elle, est occupée par le groupement benzyle dans le cas de la bestatine et partiellement par le brome dans le cas de **1a** (le brome se situe à l'entrée du sous-site S_1). En revanche les positions de leurs groupements amino sont identiques et coïncident avec le fait que lorsqu'un ligand pénètre dans le site actif, il s'oriente de manière à ce que l'amine soit bien placée, ce qui est spécifique des aminopeptidases.

⁴⁶ I. Schechter, A. Berger *Bioch. Biophys. Res. Com.* **1967**, 27, 157-162

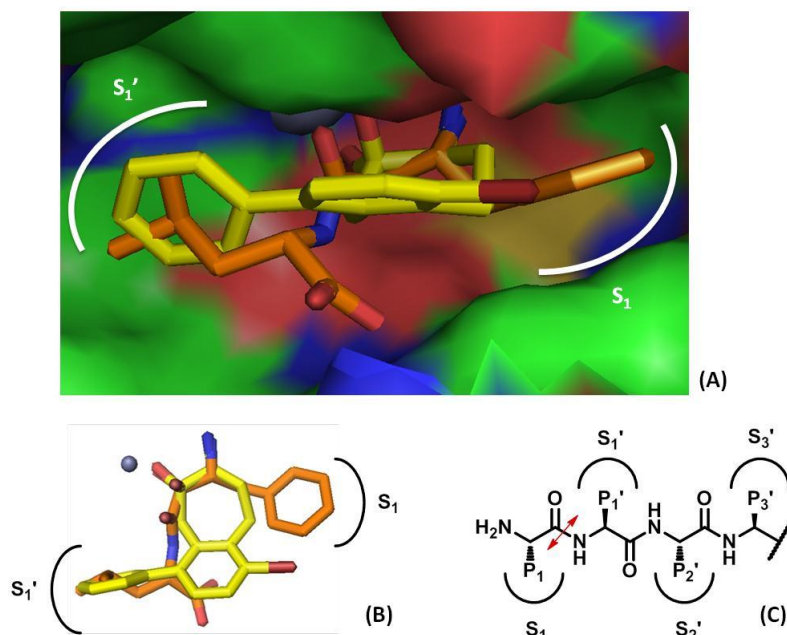


Figure 22 : Superposition de la bestatine (orange) et de **1a** (jaune) dans le site actif de l'APN d'*E. coli* et leur occupation dans les poches S₁ et S₁' (A) – Autre angle de vue de la superposition de la bestatine et de **1a** (B) – Clivage peptidique (flèche rouge) et résidus P₁ et P₁' selon la nomenclature de Schechter et Berger (C).⁴⁶

2. Complexe APN humaine - **1a**

Malheureusement, ni le Dr. Céline Schmitt, qui s'est rendu spécialement à Oxford dans l'équipe du Structural Genomic Consortium,⁴⁷ ni l'équipe canadienne,¹⁰ à qui ont été envoyés quelques uns de nos inhibiteurs, n'ont pu à ce jour obtenir des complexes d'APN humaine - **1a**. En effet, le K_i de **1a**, envers l'APN humaine, est de 0,35 nM contre 34 nM pour l'APN d'*E. coli*. Cette nette différence d'inhibition indique des distinctions structurales subtiles qui restent à définir.

Nous pouvons néanmoins superposer les deux structures et en analyser les différences : que ce soit dans l'APN d'*E. coli* ou humaine, il y a une boucle flexible qui est positionnée à l'entrée du site actif (Figure 23). L'analyse structurale de l'APN humaine sous sa forme native (code PDB : 4FYQ) nous révèle la présence d'un résidu Phe 896, non présente dans le cas de l'APN d'*E. coli*, susceptible de faire une interaction de type π -halogène. Le brome se positionnerait alors à 4-5 Å du résidu Phe 896 et établirait une interaction suffisamment forte pour expliquer la forte inhibition de **1a** envers l'APN humaine.

⁴⁷ Le Pr Tarnus et le Dr Oppermann ont également établi une collaboration dans le but de produire et de cristalliser l'APN humaine

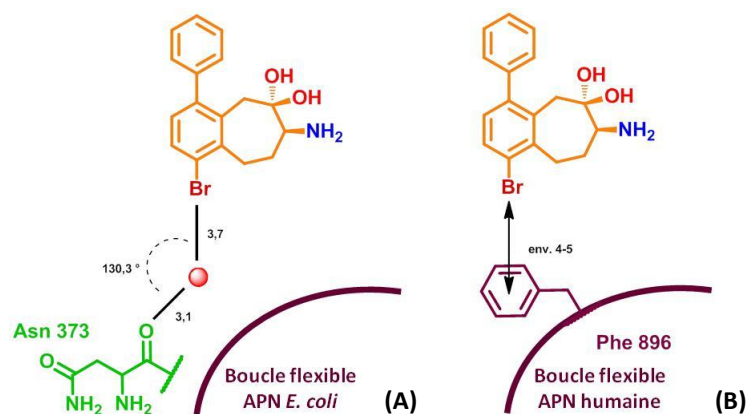


Figure 23 : Interaction de type XWH dans le complexe APN *E. coli*-**1a** (A), interaction supposée de type « halogène- π » dans le cas du complexe APN humaine-PhBr (B).

La molécule **1a** est, sans conteste, un inhibiteur puissant et sélectif de cette enzyme.⁴⁸ Il est, à présent, essentiel d'évaluer ses effets *in vitro* et *in vivo*, qui sont présentés dans une troisième partie.

⁴⁸ S. Albrecht, M. Al-Lakkis-Wehbe, A. Orsini, A. Defoin, P. Pale, E. Salomon, C. Tarnus, J.-M. Weibel *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 1434-1449

III. Stratégie anticancéreuse étudiée au laboratoire – thérapie antiangiogénique et cytotoxique

A. Positionnement du projet

Les objectifs de la thérapie anticancéreuse consistent à cibler le plus spécifiquement possible, l'ensemble des fonctions activées au cours de la carcinogenèse. Récemment de nouveaux protocoles de thérapies ciblant spécifiquement la voie de l'angiogenèse tumorale via le VEGF (Annexe 1) ont été intégrés aux chimiothérapies conventionnelles. Cependant, seulement 40 % des patients répondent à ces traitements et dans les 6 à 12 mois suivants, la majorité (75 %) des patients répondeurs développent une résistance.⁴⁹ D'une manière générale, ces traitements ralentissent, dans un premier temps, la croissance tumorale, puis *in fine* accélèrent le pouvoir invasif et métastatique des cellules malignes. Enfin, ces thérapies s'accompagnent d'effets secondaires sévères : hypertension artérielle, saignements, réaction cutanée et, dans certains cas, perforation gastro-intestinale.^{50,51}

Dans le but d'améliorer le potentiel anti-tumoral de la thérapie anti-angiogénique, une stratégie thérapeutique additionnelle consisterait à lui associer d'autres molécules telles que la Rapamycine, utilisée lors d'études pilotes menées avec la collaboration du Dr Dominique Guénot et présentées ci-après (cf. p. 56).

Le concept de normalisation des vaisseaux tumoraux^{52,53,54,55} permettrait d'expliquer l'effet synergique qu'apporterait les agents anti-angiogéniques associés, par exemple, à des cytotoxiques (Figure 24).

⁴⁹ A. Neuville, C. Nicolet, N. Meyer, A. Schneider, M. Legrain, C. Brigand, B. Duclos, Ph. Bachellier, P. Oudet, J.-P. Bellocq, M. Kedinger, M.-P. Gaub, D. Guénot *Human Pathol.* **2011**, 42, 244-253

⁵⁰ F. Elice, F. Rodeghiero *Thrombosis Res.* **2012**, 129, S50-S53

⁵¹ B. Mennequier, P. Oudet, N. Prim, D. Debrieuvre, N. Girard, V. Stockemer, conférence-débat : *Cancer bronchique : point sur les antiangiogéniques* **12 septembre 2012**, Maison de la Région Alsace - Strasbourg

⁵² R. K. Jain *Science* **2005**, 307, 58-62

⁵³ R. K. Jain, D. G. Duda, J. W. Clark, J. S. Loeffler *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **2006**, 3, 24-40

⁵⁴ P. Carmeliet, R. K. Jain *Nature* **2011**, 473, 289-307

⁵⁵ P. Carmeliet, R. K. Jain *Drug Discov.* **2011**, 10, 417-427

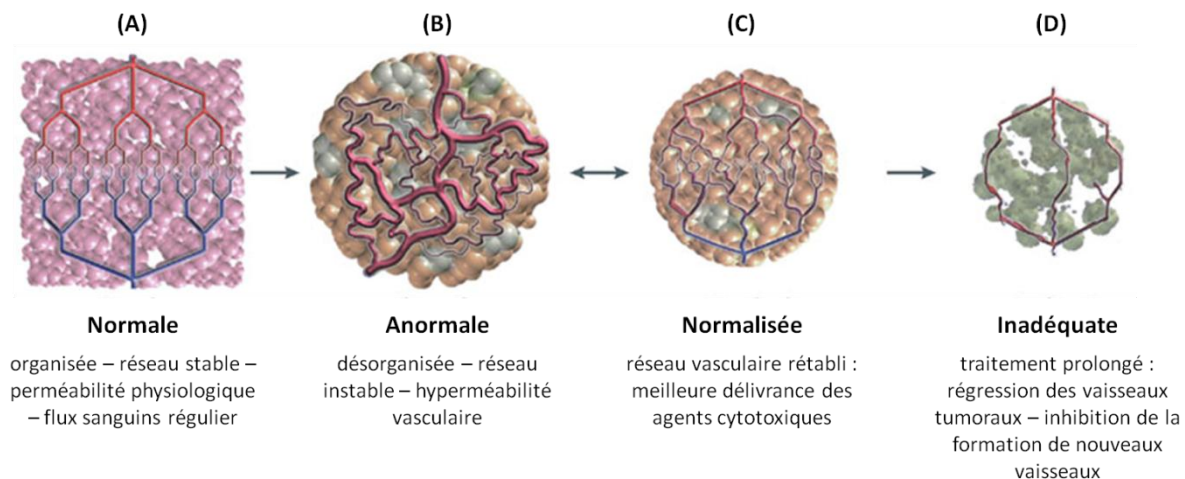


Figure 24 : Concept de normalisation de la vascularisation tumorale.⁵⁶

Contrairement au réseau vasculaire normal (Figure 24A), le réseau vasculaire tumoral présente une organisation anarchique et instable (Figure 24B). Cette désorganisation est rétablie par l'administration d'un anti-angiogénique : cela conduit à une hausse de l'oxygénation tumorale induisant une meilleure délivrance des agents cytotoxiques (Figure 24C). Avec un traitement prolongé, il se produit une inhibition de la formation de nouveaux vaisseaux tumoraux engendrant un ralentissement de la croissance tumorale (Figure 24D). Bien que le traitement apparaisse efficace au départ, il semblerait que la normalisation des vaisseaux tumoraux corresponde à un phénomène transitoire. En effet, les cellules cancéreuses peuvent acquérir des mécanismes de résistance aux agents anti-angiogéniques, et reprendre une croissance anarchique (Figure 24B).²³

⁵⁶ R. K. Jain, E. Di Tomaso, D. G. Duda, J. S. Loeffler, A. G. Sorensen, T. T. Batchelor *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 610-622

B. Inhibition des APNs porcine, murine et humaine

Avant de détailler les études *in vitro* et *in vivo*, menées par les biologistes de notre équipe et celle du Dr Dominique Guénot, qui ont fait l'objet d'une publication récente,⁵⁷ des études d'inhibition ont tout d'abord été réalisées sur les APNs de mammifères *i.e.* de porc, de souris et humaine à partir de **1a**, **1b** et **1c** (dérivés les plus intéressants dans notre étude) afin de vérifier si nous pouvions agir sur l'angiogenèse (cellules vasculaires) et sur les cellules tumorales dans des modèles cellulaires ou de xénogreffes humaines chez la souris *nude* (Tableau 8).

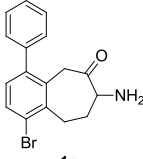
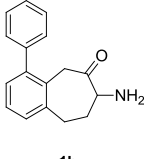
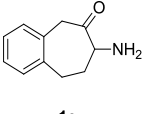
Inhibiteurs synthétisés au laboratoire	 1a	 1b	 1c
K_i APN porcine	$0,06 \pm 0,02$ nM	$7,0 \pm 1,5$ nM	$1,0 \pm 0,5$ μ M
K_i APN de souris	$0,2 \pm 0,3$ nM	$10,0 \pm 6,2$ nM	$2,0 \pm 1,1$ μ M
K_i APN humaine	$0,35 \pm 0,24$ nM	$11,0 \pm 2,4$ nM	$2,0 \pm 0,7$ μ M

Tableau 8 : K_i des APNs porcine, murine et humaine des inhibiteurs de aminobenzosubérone **1a**, **1b** et **1c**

De toute évidence, le dérivé **1a** est celui qui inhibe le plus fortement l'APN, qu'elle que soit l'espèce étudiée. L'importante inhibition de **1a** corrobore les explications issues des analyses RX apportées dans la partie précédente (cf. p. 48). Toutefois, il demeure intéressant de poursuivre l'étude avec les inhibiteurs **1b** et **1c** pour les raisons suivantes :

- Ils inhibent l'enzyme respectivement à des concentrations micromolaires et nanomolaires qui sont des valeurs de K_i satisfaisantes pour étudier les effets Doses/Réponses.
- L'accès aux dérivés **1b** et **1c** est plus aisé que dans le cas de **1a** car les voies de synthèses sont plus courtes, et par voie de conséquence, plus faciles à mettre en œuvre.
- La différence de lipophilie due à la présence supplémentaire d'un phényle et d'un brome sur la molécule pourrait modifier sa biodisponibilité et être moins efficace *in vivo*.

⁵⁷ C. Schmitt, M. Voegelin, A. Marin, M. Schmitt, F. Schegg, P. Hénon, D. Guenot, C. Tarnus *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 2135-2144

D'une manière générale, la classe de composés, sur laquelle notre équipe travaille, inhibe efficacement l'APN. Il serait, à présent, intéressant de connaître les éventuelles conséquences de cette inhibition en effectuant des tests sur différents modèles cellulaires.

C. Evaluations *in vitro* des dérivés **1a**, **1b** et **1c**

Comme il a été dit auparavant, plusieurs études suggèrent que l'APN semble moduler l'angiogenèse et la dissémination tumorale. Des études *in vitro* sur des modèles de morphogenèse endothéliale et sur la motilité cellulaire ont été ainsi menées sur différents types cellulaires.

1. Action des inhibiteurs sur la formation de tubes capillaires sur HUVEC

Des HUVECs, cellules exprimant fortement l'APN et classiquement utilisées pour ce type d'étude, ont été utilisées afin d'observer une éventuelle inhibition de la formation de tubes capillaires (Figure 25).

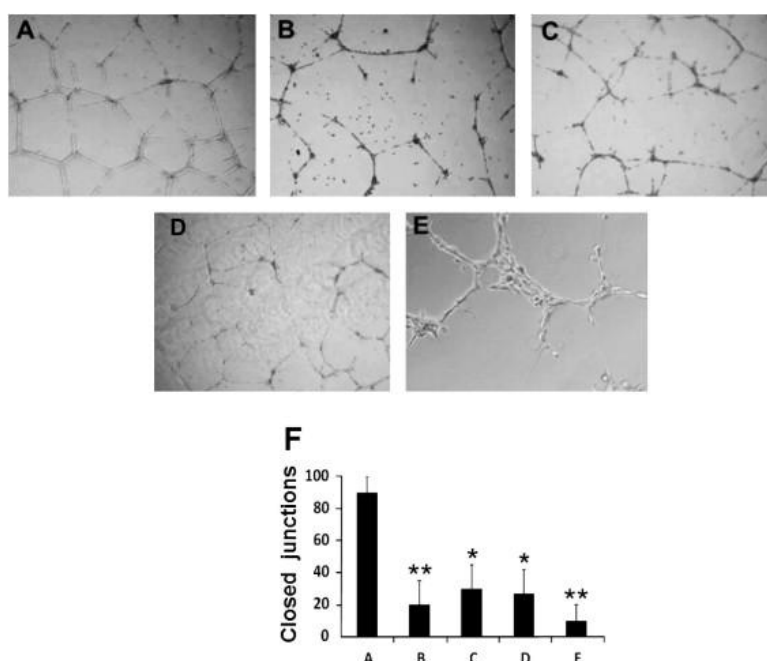


Figure 25 : Formation de tubes capillaires par les HUVECs en normoxie. (A) contrôle. (B) bestatine à 300 µM ($K_i = 3,5$ µM). (C) **1c à 10 µM ($K_i = 6$ µM). (D) **1b** à 1 µM ($K_i = 56$ nM). (E) **1a** à 1 µM ($K_i = 0,35$ nM). (F) % jonctions capillaires calculées à partir des images (A)-(E). * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.**

Les cellules endothéliales ont la capacité de s'organiser spontanément en tubes capillaires lorsqu'elles sont déposées sur une matrice cellulaire artificielle de type Matrigel®. La formation de ces capillaires est étudiée en présence de nos composés.

L'analyse de ces résultats montre que les molécules **1a**, **1b** et **1c** inhibent la formation des tubes capillaires à de faibles concentrations de 10, 1 et 1 μM ;⁵⁸ les quelques tubes formés sont, par ailleurs, particulièrement fins. La bestatine - connu pour inhiber non sélectivement l'APN - nécessite une concentration au moins 30 fois supérieure pour proposer des effets similaires. A la vue de ces premiers résultats, obtenus dans le cas de nos inhibiteurs, nous pouvons conclure que l'inhibition de l'APN perturbe l'organisation spontanée de cellules endothéliales en capillaire : phénomène dépendant de la dose et de la puissance de l'inhibiteur.

Pour les prochaines études, et compte tenu de l'inhibition moins marquée dans le cas du composé **1c**, seules les molécules **1a** et **1b** seront évaluées.

2. Influence des inhibiteurs sur la motilité cellulaire sur HUVEC, Caco2/TC7

Au même titre que les HUVECS, le modèle Caco2/TC7, lignée cellulaire cancéreuse du côlon (adénocarcinome), exprime également, mais dans une moindre mesure (8 fois), l'APN.⁵⁹ La motilité cellulaire a été étudiée en utilisant le test de comblement de lésion « wound healing assay » (Figure 26).⁶⁰

⁵⁸ Il est à noter que ces doses sont non-cytotoxiques car les valeurs de CD_{50} sont respectivement de 100, 10 et 10 μM

⁵⁹ Expression relative d'ARNm d'APN de 68,5 % pour les HUVECs et de 8,5 % pour les cellules Caco2/TC7

⁶⁰ « Blessure / Comblement »

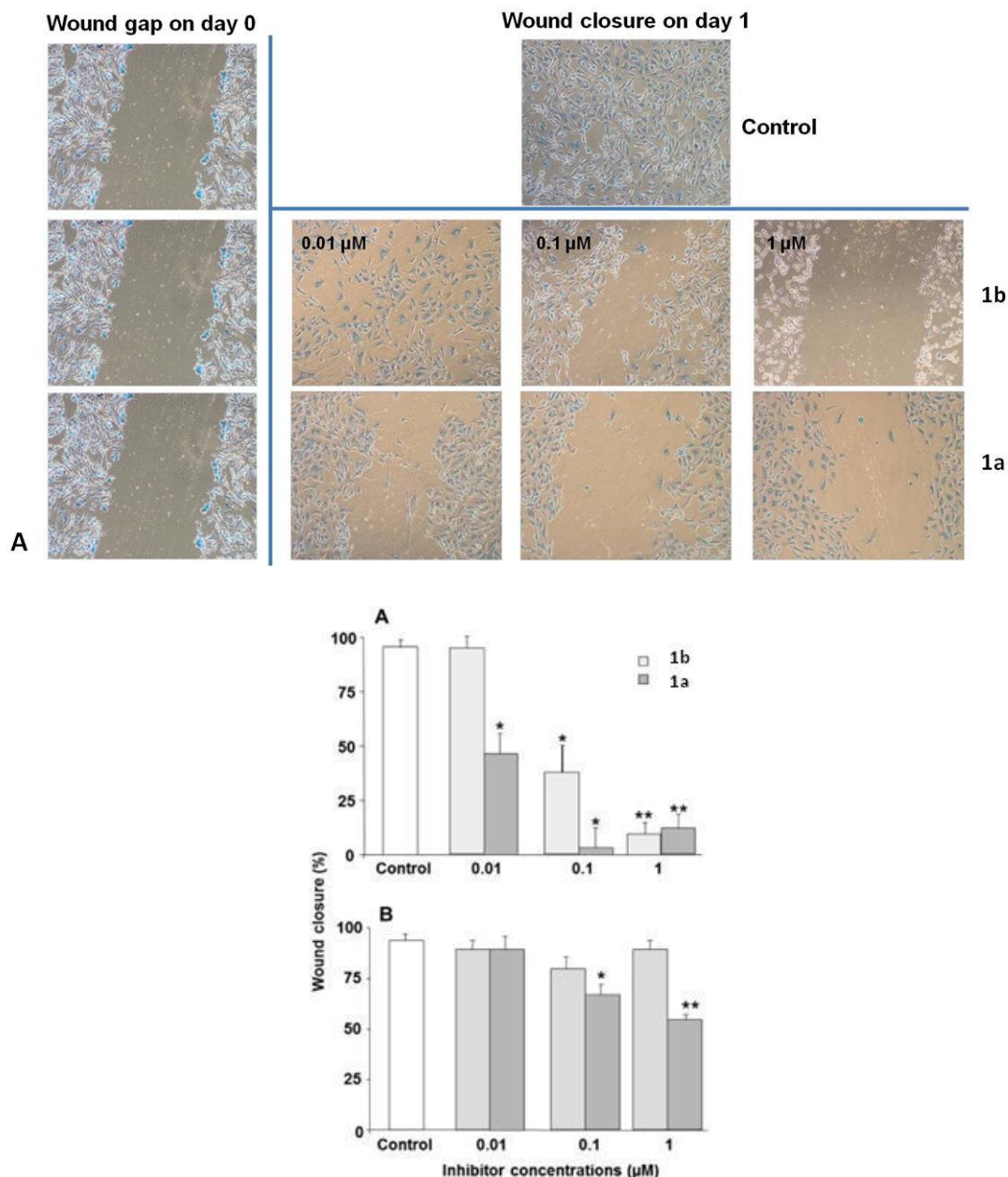


Figure 26 : Etudes de comblement de lésion. (A) HUVECs, (B) cellules Caco2/TC7 en présence d'1b et 1c après 16 h d'incubation. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

Les cellules adhérentes ont été mises en culture jusqu'à former une couche cellulaire uniforme. Une blessure est réalisée au sein de cette couche cellulaire et son comblement, après 72 h, est analysé, en présence de différentes concentrations d'inhibiteurs.

D'une manière générale, dans les HUVECs, 1a est la molécule inhibant le plus notablement la migration cellulaire : ce phénomène est déjà nettement observable à une faible concentration de 0,01 μM . En revanche, même à une forte concentration, l'inhibition de la migration des cellules Caco2/TC7 est peu prononcée mais reste plus marquée dans le cas d'1a. Ceci est peut-être lié au taux d'expression d'APN huit fois moins important dans le cas

de la lignée Caco2/TC7 par rapport aux HUVECs.⁵⁹ Il existe alors bien une relation entre l'inhibition de l'APN et la migration cellulaire.

D'autres études ont été réalisées et ont confirmé ces analyses. Mais dans le cadre de ce manuscrit nous nous attacherons à développer, à présent, les études *in vivo* menées chez la souris *nude*.

D. Evaluations *in vivo* des dérivés **1a** et **1b**

L'APN est une des cibles étudiées pour des thérapies anti-angiogéniques.⁶¹ Pour conforter cette thèse, les données *in vitro* sont bien décrites dans la littérature. En revanche les publications sur les études *in vivo* sont très rares et peu documentées.^{4,62,63}

1. Effets des inhibiteurs sur la croissance de tumeurs xénogreffées

Dans cette étude est comparée l'efficacité d'**1a**, d'**1b** et d'un anticorps anti-angiogénique anti-VEGF, l'Avastin® sur des modèles de souris nues xénogreffées avec une lignée cancéreuse A-673 (rhabdomyosarcome) sur souris *nude* (Figure 27).⁶⁴

⁶¹ N. Haraguchi, H. Ishii, K. Mimori, F. Tanaka, M. Ohkuma, H. M. Kim, H. Akita, D. Takiuchi, H. Hatano, H. Nagano, G. F. Barnard, Y. Doki, M. Mori *J. Clin. Invest.* **2010**, *120*, 3326 et références citées dans la publication

⁶² L. Guzman-Rojas, R. Rangel, A. Salameh, J. K. Edwards, E. Dondossola, Y. G. Kim, A. Saghatelian, R. J. Giordano, M. G. Kolonin, F. I. Staquicini, E. Koivunen, R. L. Sidman, W. Arap, R. Pasqualini *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 1637-1642

⁶³ H. Fujii, M. Nakajima, I. Saiki, J. Yoneda, I. Azuma, T. Tsuruo *Clin. Exp. Metastasis* **1995**, *13*, 337-344

⁶⁴ Etudes réalisées par la société Oncodesign®, 20 rue Jean Mazen, B.P. 27627 – 21076 Dijon Cedex France

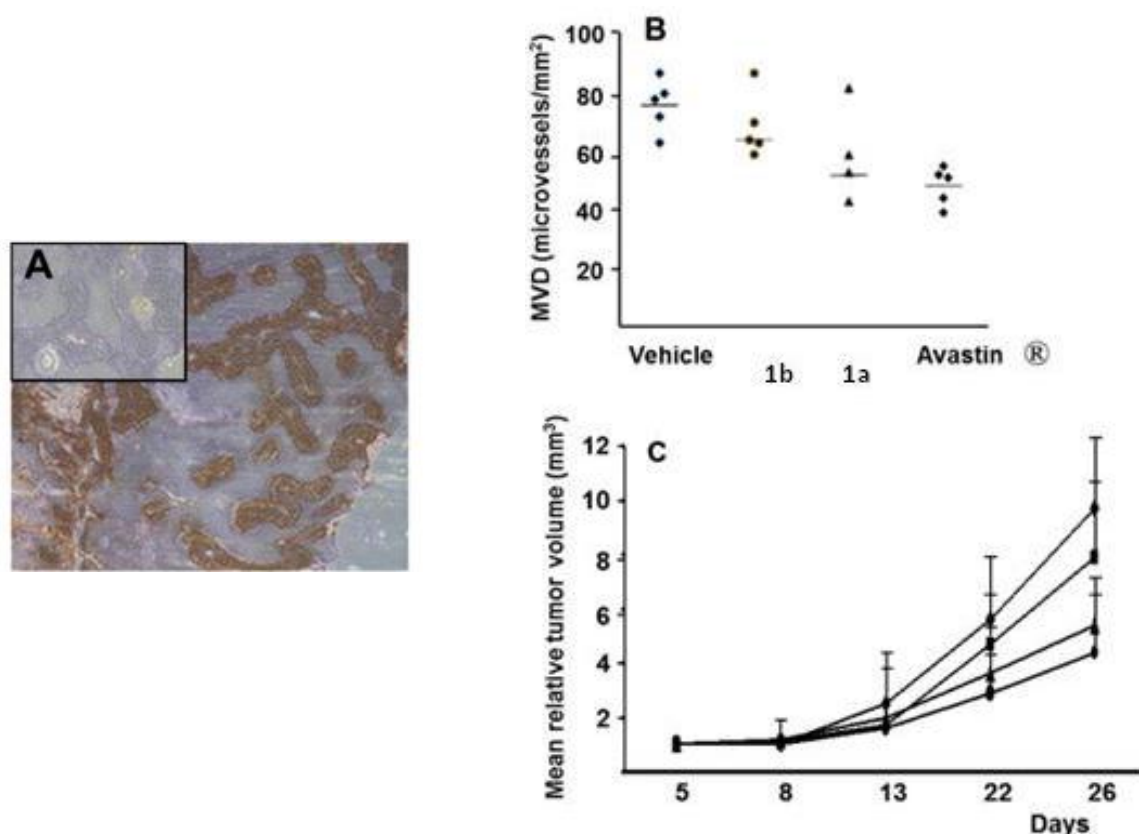


Figure 27 : Etude sur xénogreffes de lignée cancéreuse A-673. (A) Expression immunohistochimique de l'APN. (B) Analyse de la vascularisation des tumeurs A-673 en fin de traitement, (C) Effet de traitement sur la croissance des tumeurs A-673 xénogreffées en sous-cutané sur souris *nude* (n=5). (♦) : contrôle, (■) **1b** : 40 mg/kg/injection, (▲) **1a** : 30 mg/kg/injection – injection ip tous les 3 jours pour un total de 8 injections. (●) : Avastin® : 5 mg/kg/injection – injection ip 2 fois par semaine pour un total de 7 injections.

Les traitements sont effectués à J+1 après implantation des cellules tumorales. C'est un modèle où l'Avastin® montre une activité sur la croissance tumorale. Les cellules cancéreuses A-673 expriment l'APN ce qui est démontré Figure 27A, grâce à des coupes de tumeurs marquées d'anticorps anti-CD13. La vascularisation des tumeurs est bien moindre et comparable dans le cas des souris xénogreffées traitées avec **1a** et Avastin® (Figure 27B). Ce résultat peut être corrélé au volume des tumeurs qui est réduit de 44 % après 26 jours de traitement avec **1a** contre 55 % avec l'Avastin® (Figure 27C). Le traitement des souris xénogreffées par **1b** est en revanche moins efficace *e.g.* le volume des tumeurs n'est réduit que de 18 % par rapport à celles des souris non traitées (Figure 27B). Ces résultats suggèrent qu'**1a** peut agir en tant qu'anti-angiogénique à des stades précoces du développement tumoral. Toutefois, il peut s'avérer être un candidat moins efficace à des stades avancés. Ainsi, une multi-thérapie doit être considérée pour l'utilisation de ces composés.

2. Effets de **1a** en combinaison avec un cytotoxique potentiel : la Rapamycine

La Rapamycine a été isolée en 1975 à partir de la bactérie *Streptomyces hygroscopicus*. D'abord considéré comme un antibiotique de type macrolide,⁶⁵ ses effets immunosuppresseurs ont été ensuite décrits en 1977.⁶⁶ Il est, à l'heure actuelle, utilisée principalement en tant qu'immunosuppresseur lors de transplantation (e.g. rénale).

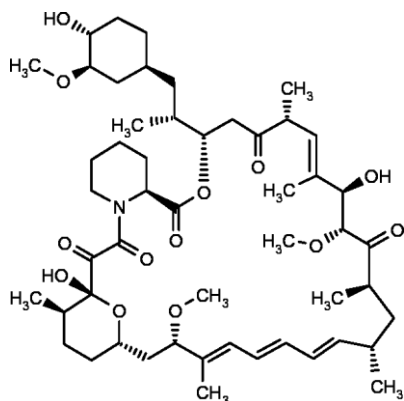


Figure 28 : La Rapamycine

La Rapamycine agit par inhibition de la protéine mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) impliquée dans l'angiogenèse tumorale, dans le développement, la prolifération et la survie des cellules cancéreuses.⁶⁷ Elle constitue alors un candidat intéressant pour renforcer l'action d'un anti-angiogénique potentiel.

a. Action de **1a** combiné à la Rapamycine sur la formation de tubes capillaires sur HUVEC

L'inhibition de tubes capillaires est évaluée en traitant les HUVECs avec **1a** seul (Figure 29B), la Rapamycine seule (Figure 29C) et la combinaison des deux (Figure 29D).

⁶⁵ S. N. Sehgal, H. Baker, C. Vezina *J. Antibiot. (Tokyo)* **1975**, 28, 727-735

⁶⁶ R. R. Martel RR, J. Klicius J, S. Galet S *Can. J. Physiol.* **1977**, 55, 48-51

⁶⁷ K. Sheppard, K. Kinross, B. Salomon, R. B. Pearson, W. A. Phillips *Crit. Rev. Oncog.* **2012**, 17, 69-95

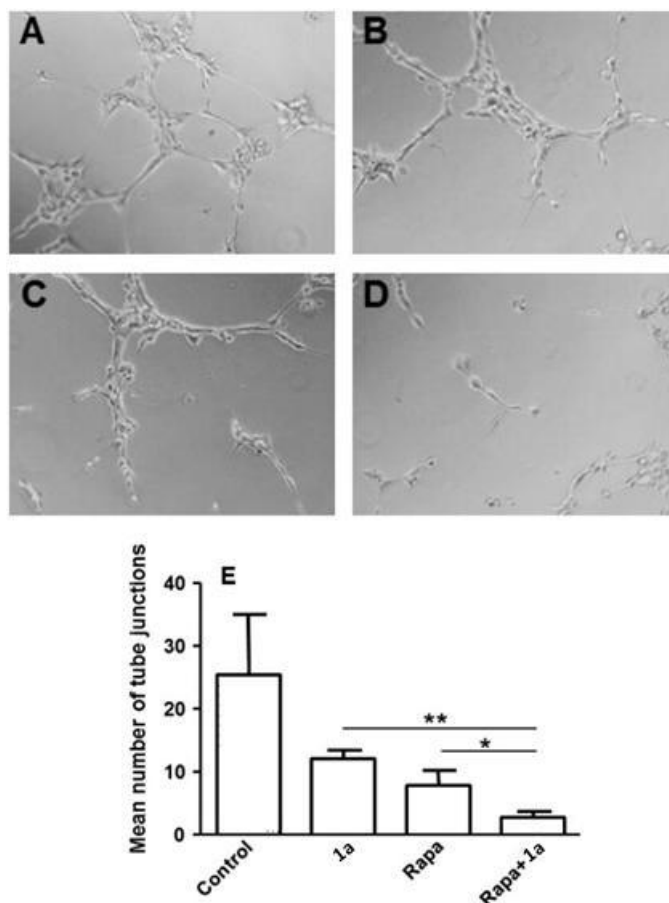


Figure 29 : Formation de tubes capillaires par les HUVECs en hypoxie. (A) contrôle. (B) 1a à 1 μ M. (C) Rapamycine à 20 nM. (D) Rapamycine à 20 nM et 1a à 1 μ M. (E) % tubes capillaires calculées à partir des images (A)-(D). * $p<0,05$ et ** $p<0,01$.

La Figure 29D et E rend bien compte de l'inhibition de la formation des tubes capillaires résultant de l'effet synergique de l'association d'1a et de la Rapamycine. En effet, dans ce cas de figure, une structure en réseau capillaire n'est pas développée. Ces résultats sont très prometteurs et nous encourageant à poursuivre avec des expériences *in vivo* basée sur cette association de composés.

b. Etudes pilotes menées sur plusieurs types de tumeurs

Pour les études *in vivo* menées chez la souris *nude*, trois modèles cancéreux, exprimant plus ou moins l'APN, ont été utilisés :

- Une lignée cellulaire cancéreuse du côlon HT29 (adénocarcinome)
- Deux tumeurs coliques humaines prélevées chez des patients

Ces études permettent, non seulement de comparer les effets d'1a, en traitement simple et en traitement combiné à la Rapamycine, sur le développement de tumeurs mais aussi

d'évaluer la réponse au traitement lorsque celles-ci sont issues de souches différentes (Figure 30).

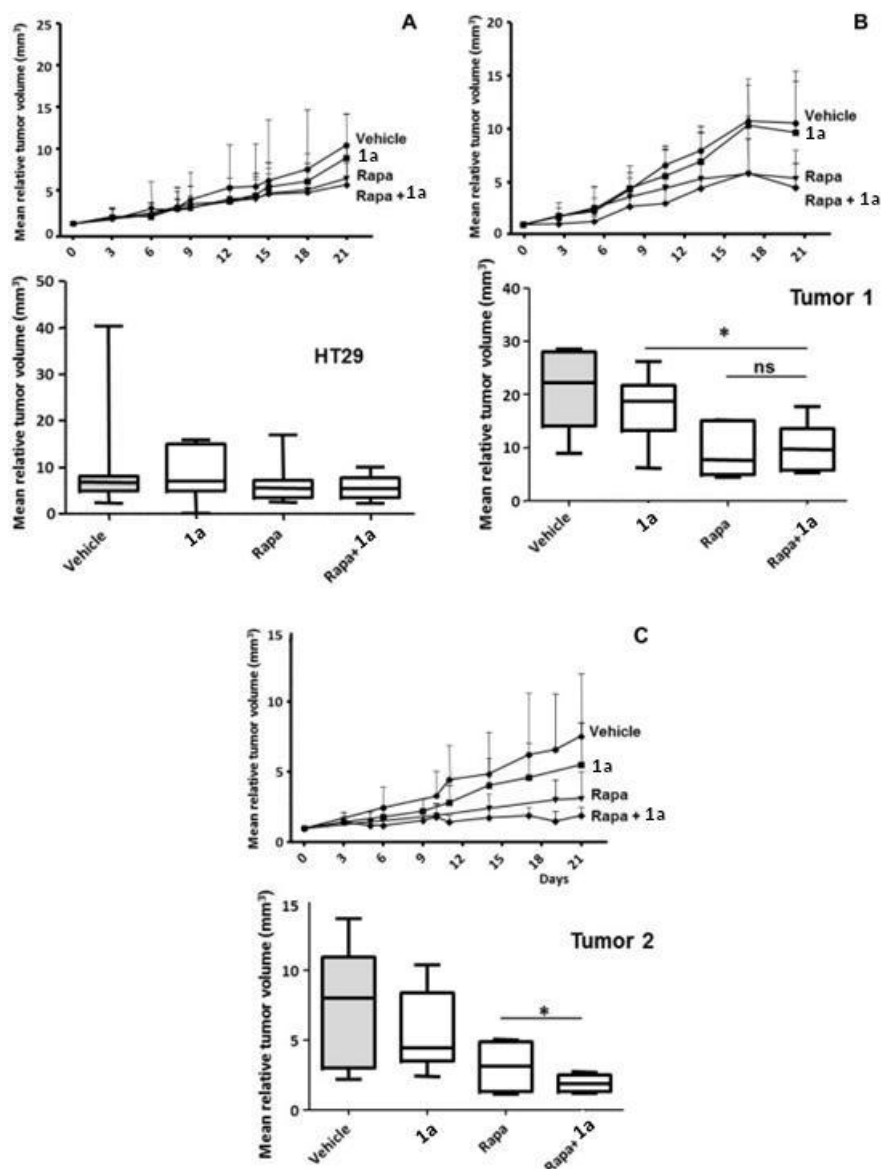


Figure 30 : Efficacité *in vivo* des traitements avec **1a** et la Rapamycine sur tumeur établie (150-300 mm³). Effets d'**1a** (30 mg/kg) avec ou sans la Rapamycine (3,3 mg/kg) sur la croissance de (A) la lignée HT29, (B) la tumeur colique humaine 1 et (C) la tumeur colique humaine 2, xéno greffées chez la souris nude. * $p < 0,05$.

Des trois modèles étudiés, les xéno greffes de tumeur colique humaine sont celles qui répondent aux trois traitements de manière différente et significative (Figure 30B et C). Mais l'effet synergique, du traitement combiné d'**1a** et de la Rapamycine, n'est observé que dans la tumeur colique 2 (Figure 30C). Cette efficacité de traitement, dans ce dernier cas, est très certainement liée au taux d'expression d'APN⁶⁸ qui est 70 fois plus élevé que dans la tumeur

⁶⁸ Expression relative d'ARNm d'APN de 73 % pour Tumor 2, de 1 % pour Tumor 1 et de 22 % pour HT29

colique 1 et 3,5 fois supérieure que dans les xénogreffes d'HT29. Il est à noter que les 3 xénogreffes ont été colonisées par le réseau veineux de la souris. Le taux d'expression de l'APN murine pourrait influencer les effets des traitements. Toutefois, puisque ces taux sont très semblables dans les 3 cas, cela suggère que le taux de vascularisation était comparable avant traitement. L'efficacité de la thérapie combinatoire semble donc essentiellement liée au taux d'expression d'APN des tumeurs à la surface des cellules tumorales.

Ces analyses demandent à être confirmés, et, réitérer ces expériences, en modifiant les doses et les fréquences d'injection, permettrait d'optimiser cette thérapie combinatoire. Néanmoins ces études pilotes ont déjà démontré que l'association de ces deux molécules (*i.e.* Rapamycine et **1a**) pourrait être une stratégie efficace à des stades précoces du développement de tumeurs exprimant l'APN.

IV. Conclusion

Bien que les résultats des études pilotes semblent prometteurs et valident notre cible pour poursuivre nos recherches, il reste encore à élucider les processus mis en jeu impliquant nos inhibiteurs. Actuellement, les controverses sont nombreuses aujourd'hui : agir sur l'angiogenèse dans le domaine de l'oncologie ne semble pas être le processus universel permettant de traiter toujours efficacement la croissance tumorale mais reste bénéfique dans certains cas.

Par ailleurs, toutes les analyses *i.e.* RX, d'inhibition, *in vitro* et *in vivo* convergent vers un même postulat : le dérivé d'amino-benzosubérone **1a** est un composé intéressant pour continuer nos études.

Des travaux présentés dans ce chapitre se dégagent deux principaux objectifs :

- La synthèse de **1a** est, comme nous allons le voir dans le chapitre II (cf. p. 67), l'étape limitante dans la poursuite des études *in vivo*. En effet celle-ci est longue et comporte plusieurs étapes délicates. Pour tenter de pallier à ces problèmes et d'introduire le centre stéréogène (S) du groupement amino révélé lors des analyses RX, deux nouvelles voies de synthèses seront proposées et étudiées.
- Les résultats très encourageants des études *in vivo* nous amènent également à concevoir et à synthétiser des inhibiteurs à double action susceptible à la fois d'inhiber le processus d'angiogenèse et de migration cellulaire ainsi que de détruire les cellules grâce à une fonction cytotoxique intrinsèque telle que le groupement ferrocényle. Ce type de molécule pourrait cibler, à la fois, les cellules endothéliales néo-angiogéniques ainsi que les cellules tumorales exprimant l'APN. La conception, la synthèse et l'évaluation de cette nouvelle génération de composés seront décrites dans le chapitre III (cf. p. 103).

CHAPITRE II

Nouvelles voies de synthèse de l'inhibiteur le plus puissant de l'APN

Compte tenu de la pertinence thérapeutique de certaines fonctions de l'APN et de sa validation lors d'études in vivo, la conception d'une voie de synthèse simple et efficace menant à l'inhibiteur le plus puissant et sélectif de cette enzyme est devenu un des objectifs premier du laboratoire.

Dans ce chapitre, nous présenterons 3 voies synthétiques différentes :

- 1. Une première synthèse est décrite dont ma contribution, en termes d'innovation, est partielle. Elle a fait l'objet d'une publication en 2012 et sera comparée aux synthèses développées avant elle.*
- 2. Une deuxième synthèse est proposée, qui aboutit une nouvelle fois au composé désiré en série racémique. Historiquement, elle précède les résultats RX obtenus par le Dr Vincent Ollieric. Son intérêt réside dans son nombre d'étapes, nettement moins important, notamment grâce à la mise en place d'un couplage de type Suzuki-Miyaura régiosélectif.*
- 3. Enfin - et là demeure toute la richesse du projet – nous exposerons une voie de synthèse visant à obtenir l'énantiomère (S) et proposant une approche à partir d'un dérivé optiquement actif simple : l'ester méthylique de la L-sérine.*

Chapitre II : Nouvelles voies de synthèse de l'inhibiteur le plus puissant de l'APN

I. Premières synthèses régiosélectives en série racémique

Depuis la fin 2006, la synthèse de l'inhibiteur le plus puissant de l'APN connu à ce jour n'a cessé d'être le moteur des recherches du laboratoire. Alors qu'en parallèle, le design de molécules pour une nouvelle génération de cibles se développait,⁶⁹ il restait important d'obtenir cette molécule de la manière la plus efficace possible.

Trois synthèses avaient déjà été développées, et nos travaux ont porté sur celle qui a fait l'objet d'une publication en 2012, qui compte en plus d'une voie principale, une voie de recyclage comme présenté Schéma 1.

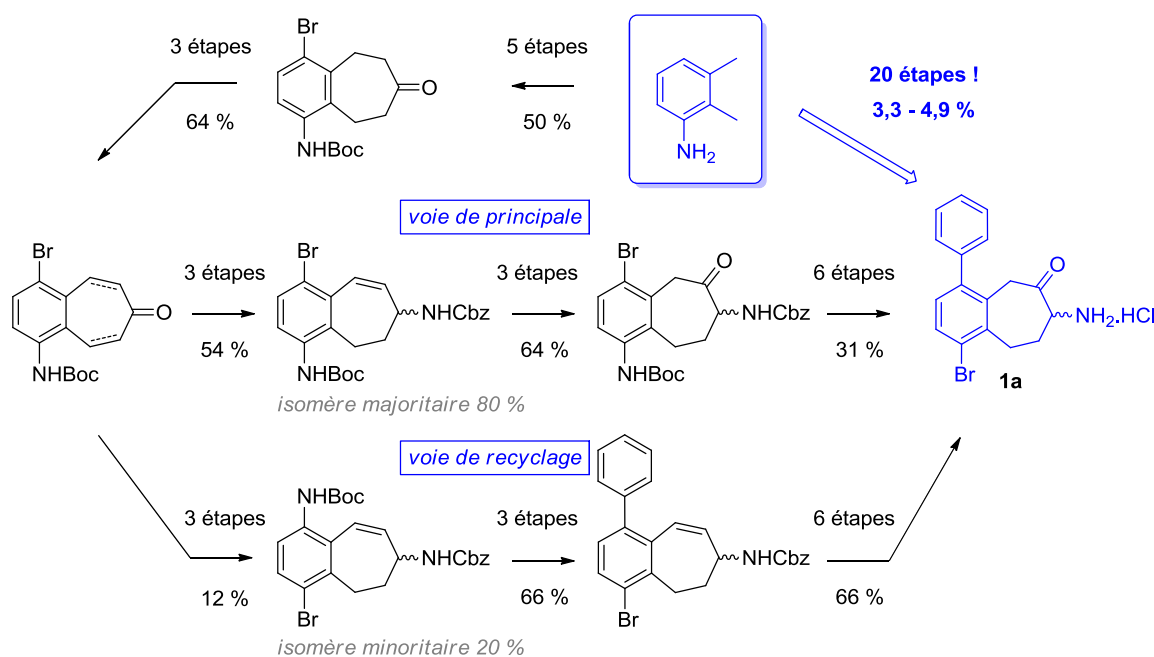


Schéma 1 : Voie de synthèse « n°1 » accédant à la 1-bromo-4-phényl-amino-benzosubérone **1a**.⁷⁰

Le dérivé **1a** est obtenu en 20 étapes avec un rendement global avoisinant les 5 %. Les étapes réactionnelles de cette voie de synthèse seront décrites en Partie A (cf. p. 72).

⁶⁹ M. Al-Lakkis-Wehbe, B. Chailloux, A. Defoin, S. Albrecht, C. Tarnus, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, article sous presse

⁷⁰ M. Al-Lakkis-Wehbe, L. Roux, C. Charrier, S. Alavi, D. Le Nouën, A. Defoin, C. Tarnus, S. Albrecht *Tetrahedron*, **2012**, 68, 6447-6455

La voie de recyclage diffère par l'étape de bromation tardive en position 4 (Schéma 2), juste avant l'introduction du groupement phényle par couplage de Suzuki-Miyaura.

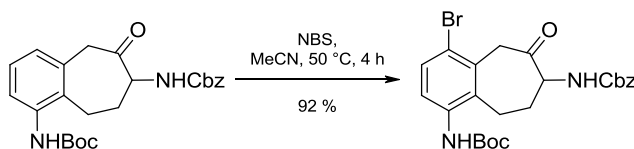


Schéma 2 : SE_{ar} du brome en position 1 – variante de la synthèse « n°1 » nommée synthèse « n°1' ».

Cette voie de synthèse a été comparée à la voie n°1 (Schéma 1). Le rendement de cette voie alternative conduit à un rendement global équivalent à la voie principale (3,6 % contre 3,3 %, respectivement).

Notre participation a été de reprendre en détail la voie principale en nous concentrant sur certaines étapes clés afin de les optimiser et d'assurer leur reproductibilité. Nous nous sommes également intéressés à la voie dite de recyclage afin d'introduire un groupement potentiellement cytotoxique de type carboranyle (travaux du Dr Lionel Roux)⁷¹ ou bien ferrocényle. Nos travaux sur les dérivés ferrocényles seront exposés dans le dernier chapitre.

Les deux autres voies de synthèse proposent :

- Une voie passant par des intermédiaires de type α -siloxy cétone qui repose sur une mise en place du groupement phényle par couplage de Suzuki-Miyaura en début de synthèse (Schéma 3)⁴⁸ dont une variante sera développée dans le chapitre III (cf. p. 136) pour la synthèse de dérivés comportant un groupement ferrocényle.

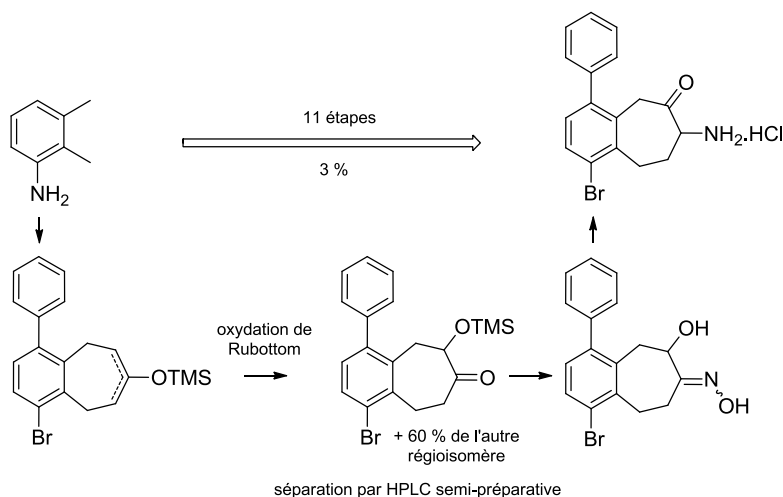


Schéma 3 : Voie de synthèse « n°2 » passant par des intermédiaires α -siloxy cétones.⁴⁸

⁷¹ Thèse de doctorat : Dr Lionel Roux *Conception et synthèse d'inhibiteurs de l'Aminopeptidase membranaire N ([EC.3.4.11.2], APN ou CD13)* 25 novembre 2010, UHA

Bien que présentant un nombre d'étapes raisonnable, son rendement global n'est que de 3 %. Cette faible valeur s'explique notamment par la régiosélectivité en défaveur du composé souhaité.

- Une voie au départ du tryptophane exploitant un agrandissement de cycle assisté par le réactif de Koser $\text{PhI}(\text{OH})(\text{OTs})$ (Schéma 4).⁷²

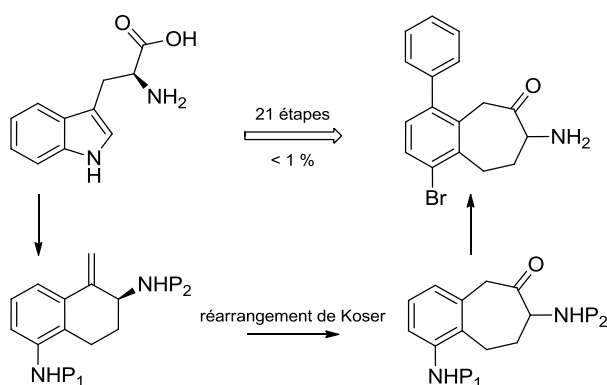


Schéma 4 : Voie de synthèse « n°3 » passant par un réarrangement de Koser.⁷²

Cette voie de synthèse, étudiée par le Dr Lionel Roux, propose une extension du réarrangement de Koser à des molécules à visée thérapeutique mais reste inadaptée pour de futures études *in vivo* car elle offre un rendement global inférieur à 1 %. Toutefois l'utilisation d'un acide aminé était une idée intéressante dans la perspective d'accéder à des dérivés énantiomériquement purs. Cet objectif n'a, néanmoins, pas pu être atteint car certaines conditions trop drastiques, utilisées lors de la synthèse, n'ont pas permis de préserver l'intégrité du centre asymétrique.

Le Tableau 9 réunit les voies de synthèse, réalisées au laboratoire jusqu'à présent, qui donnent accès à la molécule inhibant le plus efficacement et spécifiquement l'APN.

⁷² L. Roux, C. Charrier, E. Salomon, M ; Ilhan, P. Bissere, C. Tarnus *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 2586-2589

Synthèse	Nbre d'étapes	Rdt global	Régiosélectivité	Activité optique ^a
« n°1 » (principale)	20	3,3 % ^b	Bonne (80 : 20) ^c	aucune
« n°1' » (variante)	20	3,6 % ^b	Bonne (80 : 20) ^d	aucune
« n°2 » (α -siloxy cétone)	11	3 %	Mauvaise (40 : 60) ^e	aucune
« n°3 » (Koser)	21	0,8 %	/	aucune

^a activité optique du composé final^b rendement calculé sans compter la voie de recyclage^c régiosélectivité du mélange isomérique des dérivés NHCbz conjugués **9a** et **9b** (Schéma 6)^d régiosélectivité du mélange isomérique des dérivés NHCbz conjugués sans le substituant brome^e régiosélectivité du mélange isomérique des dérivés α -siloxy cétone

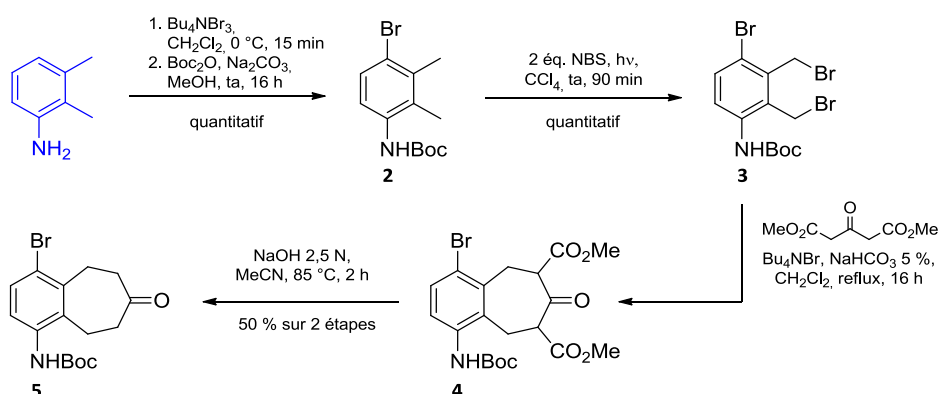
Tableau 9 : Récapitulatif des principales caractéristiques des synthèses n°1, 1', 2 et 3.

Nos travaux d'amélioration ont concerné essentiellement la synthèse **n°1** dont les étapes sont décrites ci-après.

A. Description de la synthèse **n°1**

1. Accès au système γ -benzosubérone

L'intermédiaire bicyclique **5** a été obtenu aisément en 5 étapes avec un rendement global de 50 %. Sa synthèse (Schéma 5) ne présente pas de difficultés majeures exceptée la dibromation radicalaire de la molécule **2** qui doit être idéalement réalisée dans des conditions de dilution et de temps bien spécifiques. Une concentration n'excédant pas 10 mM (environ 1 g engagé dans un réacteur de 250 mL) s'est avérée idéale (Tableau 10). En effet, dès lors que le milieu réactionnel est trop concentré, il devient moins transparent et nécessite un temps d'irradiation plus long qui favorise l'apparition de produits secondaires.

Schéma 5 : Voie d'accès au dérivé « cétone » **5**.

Entrée	Concentration en 2	Temps de réaction	Rdt isolé
A	100 mM	7 h	90 %
B	10 mM	90 min	quantitatif

Tableau 10 : Etude de la concentration du milieu réactionnel et du temps de réaction sur la réaction de dibromation radicalaire.

La concentration optimale de 10 mM est contraignante car elle nécessite des volumes importants de solvant, ce qui nous a obligé à répéter la réaction afin d'accéder à des quantités de produits suffisantes. Toutefois, dans ces conditions, le temps de réaction a pu être divisé par cinq et la pureté du produit obtenue s'est avérée meilleure.

2. Accès aux dérivés d'amine allylique

Cette partie de la synthèse permet l'introduction du groupement amino en position 7 du cycle aliphatique (Schéma 6). Dès l'obtention du dérivé **6**, un mélange de régioisomères est obtenu.

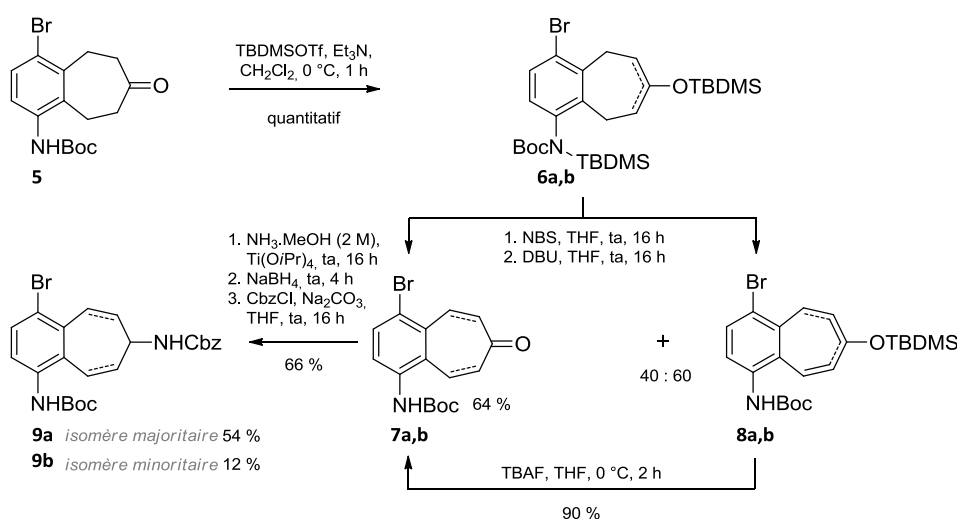


Schéma 6 : Voie d'accès aux « amines conjuguées » **9a et **9b**.**

La régiosélectivité, en faveur du composé **9a**, peut s'expliquer par la gêne stérique apportée à la fois par le groupement Boc et le groupement TBDMS, lors de l'étape de formation de l'éther d'énol silylé (Schéma 7).

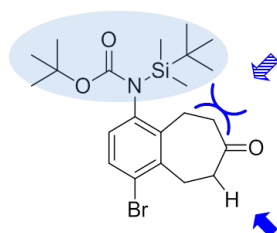


Schéma 7 : Explication simplifiée de la régiosélectivité observée lors de la formation de l'éther d'énol silylé **6.**

Après les traitements au NBS et au DBU, une analyse du brut réactionnel indique que les dérivés d' α -énones ne sont obtenus qu'avec un rendement de 40 % (27 % en rendement isolé), les analogues protégés sous forme de dérivés TBDMS représentant les 60 % restant (41 % en rendement isolé). Après un traitement au TBAF, les dérivés d' α -énones correspondants ont pu être finalement obtenus avec un rendement global satisfaisant de 64 % depuis le dérivé cétone **5**.

Le mélange isomérique **9a** et **9b** a été préparé par amination réductrice des dérivés α -énones suivie d'une double séparation assez fastidieuse par chromatographie sur colonne. Il est à noter, à ce stade, que dans le cas de la synthèse **n°1'** qui repose sur la bromation du noyau aromatique lors de la 7^{ème} étape, une simple recrystallisation dans le diisopropyléther permet d'isoler exclusivement le régioisomère majoritaire.

3. Accès au précurseur α -amino-cétone par la voie principale

Ces 6 dernières étapes ont été réalisées avec un rendement global de 24 % (Schéma 8). Plusieurs voies de synthèse ont été étudiées par le Dr Mira Al-Lakkis pour positionner la cétone en position alpha de l'amine. Celle qui a finalement permis d'obtenir le dérivé amino-cétone avec le plus de succès passe par l'époxyde **10** qui est soumis à une réduction au Dibal-H. Nous avons constaté que, bien que ce dernier soit majoritairement obtenu sous forme *cis*, près de 25 % est sous forme *trans* par rapport au groupement NHCbz.

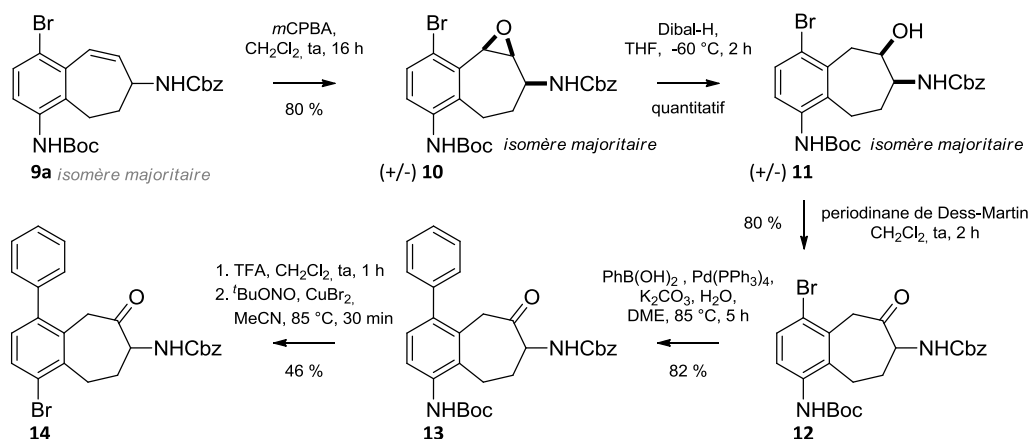


Schéma 8 : Voie d'accès principale au dérivé « α -amino-cétone » **14**.

L'oxydation en cétone a ensuite été réalisée dans des conditions douces grâce à l'utilisation du réactif de Dess-Martin. Le mécanisme d'oxydation a été décrit par Dess et Martin dans les années 80 (Schéma 9).⁷³

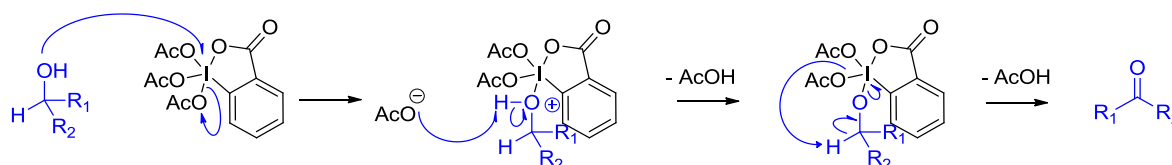


Schéma 9 : Mécanisme d'oxydation de Dess-Martin à partir d'un alcool secondaire.⁷³

Le couplage de Suzuki-Miyaura avait été réalisé jusqu'à présent dans des conditions de chauffage classiques. Cependant, la réaction s'est avérée « plus propre » (et conduisant ainsi à un rendement supérieur de 92 % au lieu de 82 %) en maintenant le milieu réactionnel sous irradiation micro-onde. Toutefois, le volume des flacons utilisés étant limité à 5 mL, cette méthode ne peut être privilégiée lorsque plus de 0,5 mmol de produit **12** est engagé.

L'étape de bromation sur le noyau aromatique par réaction de Sandmeyer ne présentait, selon mes prédécesseurs, aucune difficulté. En respectant les conditions opératoires préconisées (16 h à ta puis 4 h au reflux), nous avons observé jusqu'à 40 % de produits dibromés **15a** et **15b** non séparables du dérivé monobromé **14** (Schéma 10).

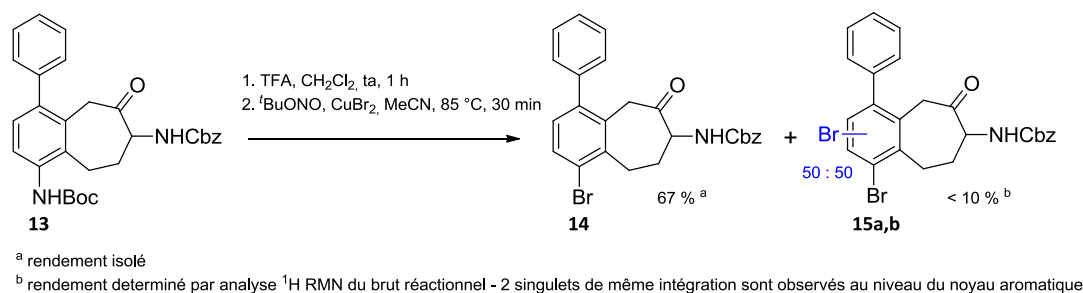


Schéma 10 : Produits **14**, **15a** et **b**, obtenus depuis une réaction de Sandmeyer.^{74,75}

Lors de réactions de Sandmeyer utilisant les mêmes conditions, Doyle *et al.*^{76,77,78} avaient également obtenus des dérivés secondaires *p*-dibromobenzène et 1,2,4-tribromobenzène à partir de l'aniline.⁷⁶

⁷³ D. B. Dess, J. C. Martin *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4155-4156

⁷⁴ N. Brown, D. Luo, J. A. Decapo, K. R. Buszek *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 7113-7115

⁷⁵ N. Vilà, Y.-W. Zhong, J. C. Henderson, H. D. Abruña *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 796-804

⁷⁶ M. P. Doyle, B. Siegfried, J. F. Jr. Dellaria *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 2426-2431

Plusieurs essais ont été nécessaires afin d'optimiser la réaction de Sandmeyer jusqu'à obtenir des proportions inférieures à 10 % en produits secondaires. Le temps de réaction, l'ordre d'addition et la température se sont avérés être des paramètres à contrôler avec rigueur. De plus, même dans ces conditions, dès lors que les quantités engagées dépassaient 0,1 mmol en **13**, la réaction n'était plus reproductible.

4. Accès au précurseur α -amino-cétone par la voie de recyclage

Bien que la synthèse que nous venons de décrire soit longue dans son ensemble, elle présente l'avantage d'avoir une voie de recyclage au rendement global très satisfaisant de 54 % (Schéma 11).

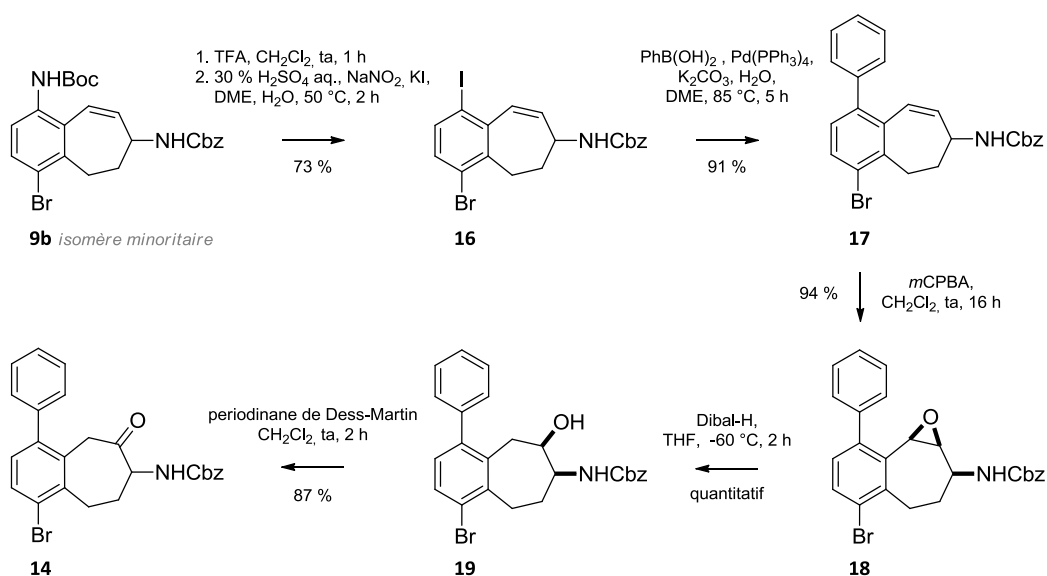


Schéma 11 : Voie d'accès, dite de recyclage, au dérivé « α -amino-cétone » **14**.

Nous n'avons eu aucun problème à reproduire cette voie dite de recyclage, non seulement au niveau de la réaction de Sandmeyer mais aussi des autres réactions dans les mêmes conditions que celles de la voie principale.

5. Accès au dérivé chlorhydrate d'ammonium **1a**

La déprotection du groupement Cbz avait déjà été testée par mes prédécesseurs par hydrogénéolyse sur Pd/C 5 % dans un mélange dioxane/EtOH en présence d'HCl 1 N aq.

⁷⁷ M. P. Doyle, W. J. Bryker *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 1572-1574

⁷⁸ M. P. Doyle, M. A. Van Lente, R. Mowat, W. F. Fobare *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 2570-2575

Malheureusement, dans ces conditions, un mélange complexe de produits (dont la débromation au niveau du noyau aromatique) a été obtenu.

La littérature propose une alternative, en absence de palladium, utilisant seulement des conditions acides (HCl 5 N aq.) à haute température⁷⁹ comme présenté Schéma 12, transposées à notre cas, ces conditions de déprotection n'ont pas permis d'obtenir le produit déprotégé **1.HCl**.

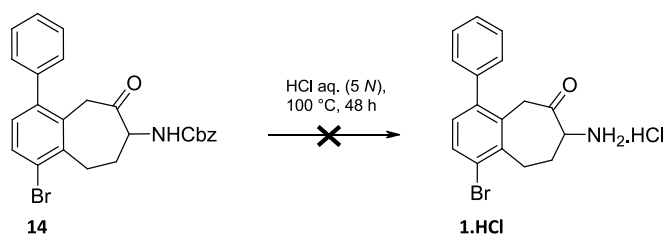


Schéma 12 : Déprotection infructueuse du groupement NHCbz dans des conditions acides (HCl aq. 5 N).⁷⁹

Notons qu'un autre essai a été tenté, toujours sans succès, en employant HCl.Et₂O (5 M).

La déprotection du groupement NHCbz a pu être réalisée, à ce stade, en utilisant une solution d'HBr à 33 % dans l'acide acétique, comme présenté Schéma 13. Le bromhydrate d'ammonium **1a.HBr** a pu être ainsi obtenu avec un excellent rendement et une très bonne pureté après une simple précipitation dans l'Et₂O.

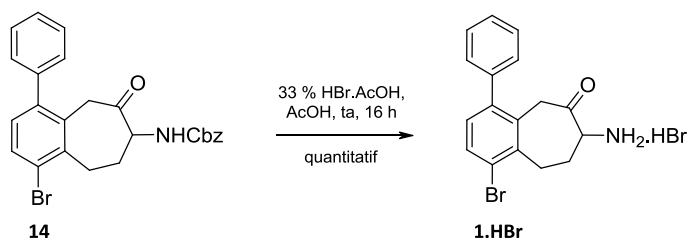


Schéma 13 : Déprotection du groupement NHCbz en présence d'HBr.AcOH 33 %.

Il est à noter que, jusqu'à présent, tous les dérivés présentant *in fine* une activité, ont été obtenus sous la forme d'un chlorhydrate d'ammonium. Généralement, en chimie médicinale, le contre-ion des groupements ammoniums le plus utilisé est l'ion chlorure (48 % des molécules à visées thérapeutiques contre environ 5 % pour l'ion bromure).⁸⁰ Pour ces raisons et dans un souci de rigueur pour la suite des études *in vivo*, nous avons privilégié

⁷⁹ G. Chelucci, M. Falorni, G. Giacomelli *Synthesis* **1990**, 1121

⁸⁰ L. D. Bighley, S. M. Berge, D. C. Monkhouse, ed. by J. Swarbrick & J. C. Boxlan, In *Salt forms of drugs and absorption*; Encyclopedia of pharmaceutical technology: New York, Marcel Dekker, **1996**, Vol. 13, p. 81

l'obtention d'un chlorhydrate d'ammonium. Pour ce faire, l'accès au chlorhydrate équivalent recherché a pu être réalisé, comme indiqué Schéma 14, en soumettant le bromhydrate **1.HBr** à une étape de reprotection par un groupement Boc. Cette fois-ci, la déprotection a pu être réalisée sans encombre (avec HCl.Et₂O 2 M). Globalement le rendement global sur les deux étapes reste bon (> 80 %).

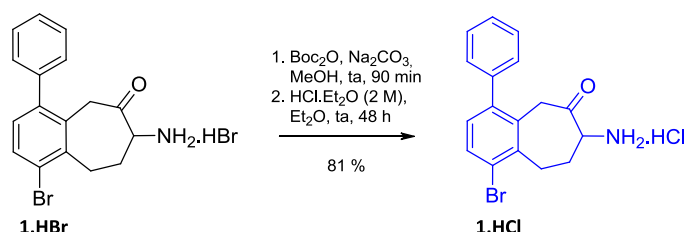


Schéma 14 : Synthèse du chlorhydrate d'ammonium **1a.HCl** à partir du bromhydrate d'ammonium **1a.HBr**.

Il ressort de cette voie de synthèse qu'elle est longue et fastidieuse, bien que certaines étapes restent faciles à mettre en œuvre. De plus, même si la voie de recyclage semble s'affranchir des difficultés rencontrées dans la voie principale, elle n'atteint qu'un rendement global de 1,6 %. Dans le cadre de futures études *in vivo*, il a donc été nécessaire d'envisager d'autres voies d'accès afin d'obtenir plus rapidement et avec un meilleur rendement le composé désiré.

II. Vers une nouvelle voie de synthèse régiosélective en série racémique

L'inconvénient majeur rencontré lors de la synthèse décrite précédemment réside dans la désymétrisation précoce du noyau aromatique. En conservant cette symétrie le plus longtemps possible dans la synthèse, des problèmes de régiosélectivité peuvent être évités. L'expertise acquise lors de la synthèse précédente nous a permis de proposer une nouvelle voie plus courte, utilisant des étapes déjà connues et fondée sur l'obtention d'un intermédiaire clé dibromé (Schéma 15).

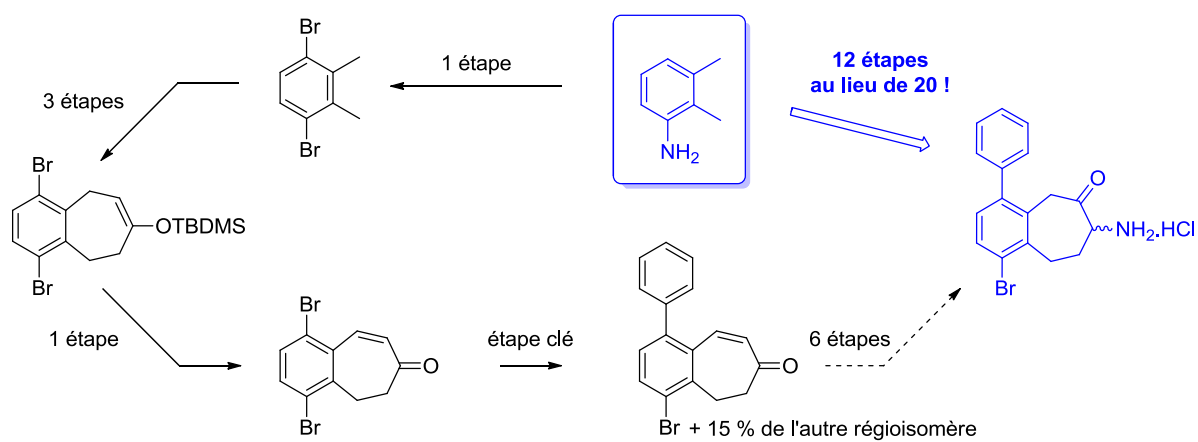


Schéma 15 : Voie de synthèse régiosélective en série racémique.

A. Accès au dérivé clé dibromé via une réaction de Sandmeyer

Les conditions réactionnelles, initialement décrites (cf. p. 72 et p. 74), ont pu être transposées à cette nouvelle voie d'accès mettant à profit une réaction de Sandmeyer, en partant de la 2,3-diméthylaniline commerciale (Schéma 16).

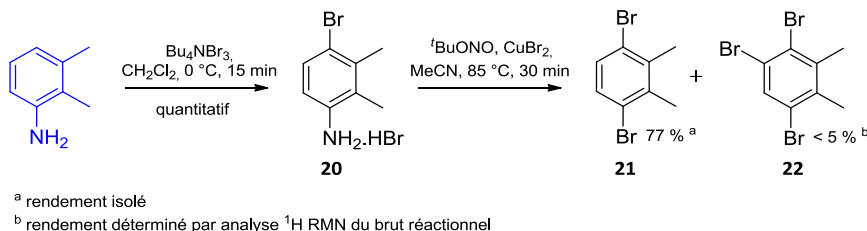
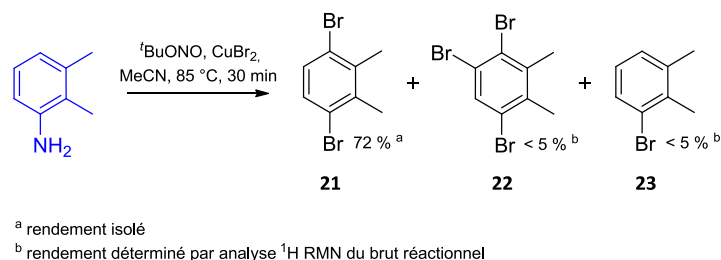


Schéma 16 : Voie initiale d'accès au dérivé 1,4-dibromo *o*-xylène **21**.

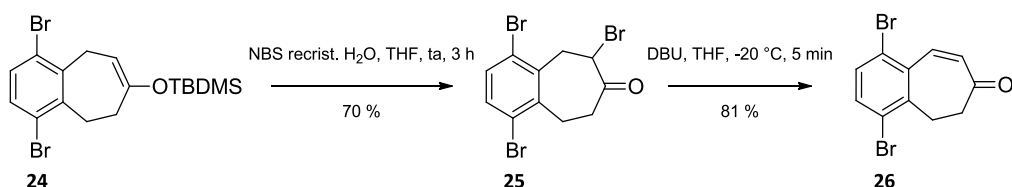
L'accès au dérivé dibromé a pu être simplifié en soumettant directement la 2,3-diméthylaniline aux conditions de la réaction de Sandmeyer (Schéma 17).

Schéma 17 : Voie d'accès, modifiée, au dérivé 1,4-dibromo *o*-xylène **21**.

Comme nous l'avons déjà observé sur le dérivé **13** (cf. p. 74), l'utilisation d'un équivalent de CuBr₂ permet d'introduire 2 atomes de brome sur le noyau aromatique.

B. Synthèse de l'intermédiaire α -énone

Initialement, nous avons suivi la voie de synthèse classiquement utilisée pour obtenir l' α -énone **26** à partir du dérivé d'éther d'énol silylé **24** comme indiqué Schéma 18.

Schéma 18 : Voie initiale d'accès au dérivé α -énone **26** à partir de l'éther d'énol silylé **24**.

Il est à noter que la reproductibilité des étapes de bromation en alpha de la cétone et d'élimination par la DBU s'est avérée, lors des premiers essais, mauvaise avec des rendements sur ces deux étapes fluctuant entre 5 et 20 %. Néanmoins, une nette amélioration a pu être apportée avec l'utilisation de NBS recristallisé dans l'eau,⁸¹ avant utilisation. Des rendements reproductibles, sur ces deux étapes, d'environ 60 % ont ainsi pu être obtenus. L'élimination d'HBr par la DBU, s'est avérée, dans ce cas, très rapide (< 5 min), ce qui contraste avec les plusieurs heures nécessaires, pour cette réaction, dans le cas des dérivés **8**. Cette différence est probablement due à l'effet électro-attracteur du brome en position 4, qui augmente l'acidité du proton en position 5. Ce type d'effet électronique rend également probablement la molécule sensible à l'oxygène.

Par la suite, l'intermédiaire α -énone a pu être obtenu aisément simplement en présence d'air à partir de l'éther d'énol silylé correspondant (Schéma 19).

⁸¹ H. J. Dauben Jr., L. L. McCoy *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4863-4873

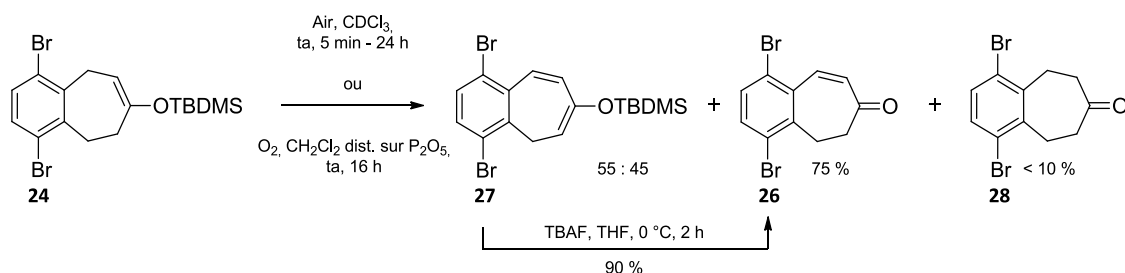


Schéma 19 : Voie d'accès, modifiée, au dérivé α-énone **26** à partir de l'éther d'énol silylé **24**.

L'obtention de ce dérivé est purement empirique et a été observée même à l'échelle du multigramme (10 mmol). Le dérivé d'éther d'énol silylé n'est en fait stable que conservé sous azote et à -20 °C. Un changement d'aspect a pu être observé dès lors que le produit est en présence d'air. Celui-ci passe en effet d'une huile jaune et fluide à une huile plus pâle et visqueuse. Lors d'une analyse ^1H RMN de contrôle du brut réactionnel, les 4 produits (dont le produit de départ) présentés Schéma 19 ont été observés. Ce résultat a pu être confirmé en réalisant la réaction, de manière contrôlée, sous O_2 . Le rendement de 75 % est également obtenu grâce à la conversion du dérivé **27** en α-énone correspondante après traitement au TBAF.

C. Couplage de Suzuki régio-contrôlé

Le couplage de Suzuki-Miyaura a été largement employé pour l'introduction de substituant sur des noyaux aromatiques. En revanche, dès lors que l'on s'intéresse à une réaction de monocouplage sur un dérivé aromatique non symétrique homodihalogéné (*e.g.* dibromé), les travaux sont quasi inexistant. Un des rares exemples, à notre connaissance, proposant une régiosélectivité lors d'un couplage de Suzuki-Miyaura est le suivant (Schéma 20).⁸²

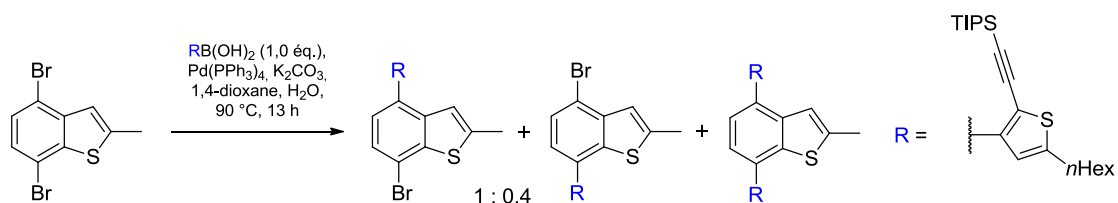
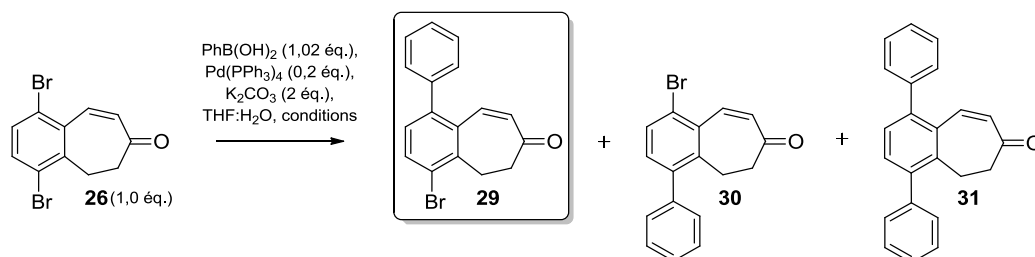


Schéma 20 : Exemple de couplage de type Suzuki-Miyaura proposant une régiosélectivité modérée.⁸²

Aucune explication mécanistique n'a été donnée pour rendre compte de cette régiosélectivité, même modérée.

⁸² T. Yamamoto, H. Katsuta, K. Toyota, T. Iwamoto, N. Morita *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2012**, *85*, 613-623

L'intermédiaire **26** s'est avéré être un candidat intéressant pour étudier la régiosélectivité du couplage de type Suzuki-Miyaura. Les différents essais que nous avons effectués sont regroupés Tableau 11.



Entrées	THF : H ₂ O	Conditions (micro-ondes)	26 ^a	29 ^a	30 ^a	31 ^a	2 produits non identifiés ^{a,b}	29 : 30
A	4 : 1	25 min, 125 bar, 200 W	5	60	10	15	10	85 : 15
B	5 : 1	25 min, 125 bar, 200 W	5	60	10	15	10	85 : 15
C	8 : 1	25 min, 125 bar, 200 W	5	60	10	15	5	85 : 15
D	8 : 1	15 min, 125 bar, 200 W	15	65	> 5	10	< 5	90 : 10
E ^c	8 : 1	15 min, 125 bar, 200 W	20	60	< 5	15	ε	90 : 10

^a pourcentage déterminé avec approximation à partir d'analyse ¹H RMN du brut - un étalon interne n'a pas été employé

^b les produits non identifiés sont en proportion 50 : 50

^c 0,2 éq. de dppf a également été employé

Tableau 11 : Etude des conditions réactionnelles permettant un couplage régiosélectif de type Suzuki-Miyaura en position 1 du dérivé **29.**

La réaction conduit à moins de produits secondaires en limitant dans le milieu, la quantité d'eau requise pour assurer la solubilisation du carbonate de potassium (entrées **B** et **C**). A ce titre, un essai a été réalisé dans le DME seul et avec CsF comme base selon les conditions citées en **D** : l'analyse ¹H RMN du brut ne nous a révélé qu'une dégradation des produits engagés.

Il ressort de cette étude que, quelles que soient les conditions de réaction du couplage de Suzuki employées, le régioisomère recherché est largement majoritaire. Après une chromatographie minutieuse sur gel de silice, les α-énones **29-31** ont pu être séparées. Diminuer le temps d'utilisation des micro-ondes réduit la formation de produit homodisubstitué mais également la conversion du réactif de départ **26** (entrée **D**). L'emploi d'un ligand, tel que le dppf, a abouti à un résultat comparable. Par la suite, cette étude de monocouplage régiosélectif a été étendue à d'autres dérivés insaturés, en utilisant les conditions optimisées précédentes (Schéma 21).

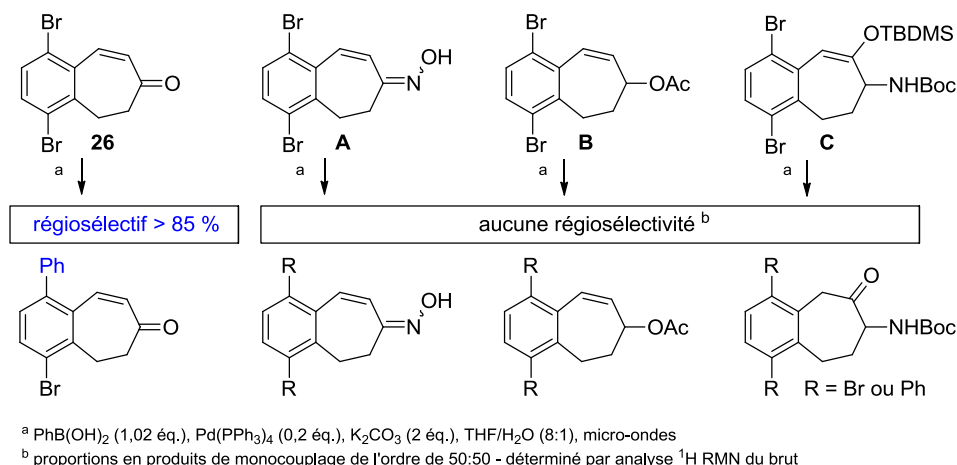


Schéma 21 : Etude du couplage de type Suzuki-Miyaura étendue à d'autres dérivés insaturés.

Bien que l'oxime conjuguée **A** soit à l'image de l' α,β insaturée, elle ne conduit pas à un couplage régiosélectif probablement à cause de son pouvoir électro-attracteur moindre. Cette absence de régiosélectivité s'applique également aux dérivés **B** et **C**.

Il résulte de cette étude préliminaire que le couplage de type Suzuki-Miyaura offre une régiosélectivité intéressante uniquement dans le cas du dérivé α -énone. Dès lors que le substrat est modifié, la régiosélectivité est totalement perdue, et les produits résultant du couplage en position 1 et un couplage homodisubstitué sont difficilement isolables et rendent cette étape assez délicate.

Parallèlement à cette stratégie, nous avons donc cherché à développer une voie plus flexible, *e.g.* donnant accès à une plus grande diversité de produits et en série optiquement active.

III. Vers une nouvelle voie de synthèse en série optiquement active

A ce stade de notre projet, nous avons pris en considération deux nouveaux éléments :

- De récentes études de solubilité effectuées par HPLC⁸³ ont démontrées que **1a** présentait une lipophilie telle que sa solubilité, en milieu aqueux, n'excède pas 8 μM . Bien que ces concentrations ne soient pas atteintes lors des études *in vivo*, cette faible valeur remet en question la potentielle biodisponibilité de ce produit. Cette valeur corrobore celle du cLogP,⁸⁴ relativement élevée dans le cas de **1a**.
- Comme il a été vu précédemment, l'analyse cristallographique du composé **1a** a mis en évidence la nature (S) du centre asymétrique porteur du groupement amino.

Compte tenu de ces données, nous nous sommes attachés à synthétiser l'analogue oxygéné isostère de **1a** - de configuration 7-(S). L'insertion de l'oxygène ne devrait pas perturber la valeur de K_i . En effet les analogues non substitués, synthétisés antérieurement au laboratoire, inhibent à une même concentration de 1 μM (Figure 31).

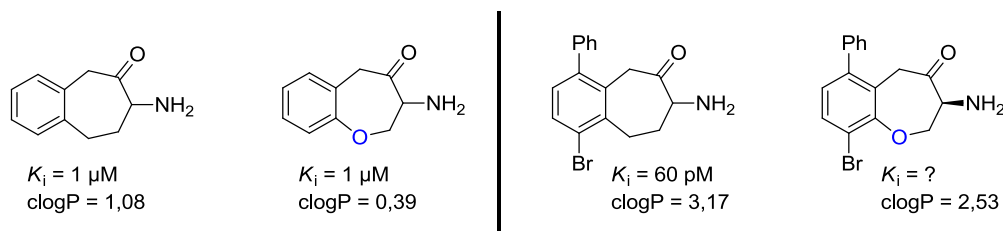


Figure 31 : Comparaison des K_i et cLogP de dérivés de type amino-benzosubérone en séries dites « carbonée » et « oxygénée ».

Une nouvelle approche synthétique, en série optiquement active, a été ainsi envisagée pour accéder à l'isostère oxygéné recherché avec un nombre d'étapes limité, comme présenté

Schéma 22.

⁸³ Analyses réalisées par la Plate-forme de Chimie-Biologie intégrative de Strasbourg PCBIS - Technologies du médicament

⁸⁴ Le cLogP, correspondant au coefficient de partage, est une valeur calculée *in silico* qui rend compte de la lipophilie de la molécule. De plus amples explications seront données dans le chapitre III.

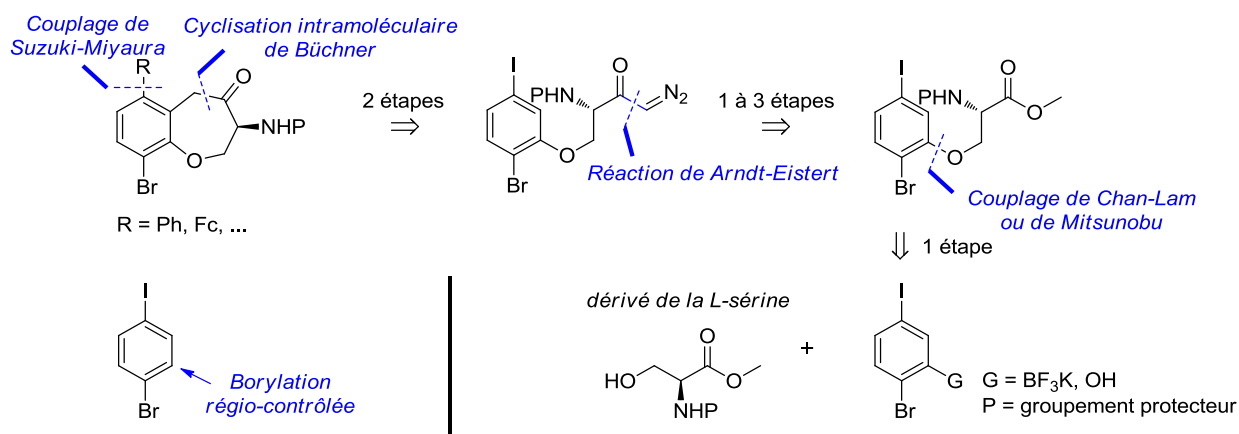


Schéma 22 : Analyse rétrosynthétique d'accès à l'analogue benzo-oxépine du dérivé 1a à partir du 1-bromo-4-iodobenzène.

Pour assurer une variation structurale au niveau de la position 4, nous avons envisagé de réaliser, en fin de synthèse, un couplage de type Suzuki-Miyaura sur le noyau aromatique du motif bicyclique, lequel peut être obtenu par cyclisation intramoléculaire de Büchner. Cette réaction requiert la formation d'un intermédiaire de type carbénoïde à partir d'un métal de transition tel que le rhodium et d'un dérivé α -dialcoyle. Ce dernier est classiquement obtenu via une réaction de Arndt-Eistert. Le centre stéréogène est apporté par le dérivé de la L-sérine couplée, par une réaction de type Chan-Lam ou encore de Mitsunobu, au noyau aromatique respectivement borylé ou hydroxylé. Cette voie de synthèse repose donc essentiellement sur l'obtention du composé grâce à une réaction de borylation régio-contrôlée, à notre connaissance, inédite.

Revenons sur chacune de ces étapes.

A. Cyclisation intramoléculaire de Büchner

La cyclisation intramoléculaire de Büchner est une des étapes clés de cette nouvelle voie de synthèse. Nous avons donc souhaité, dans un premier temps, nous concentrer sur sa faisabilité à partir d'un dérivé simple : l'acide 3-phénoxypropanoïque. L'accès au dérivé α -dialcoyle 33, précurseur clé de la cyclisation, est possible grâce à la séquence réactionnelle décrite Schéma 23.

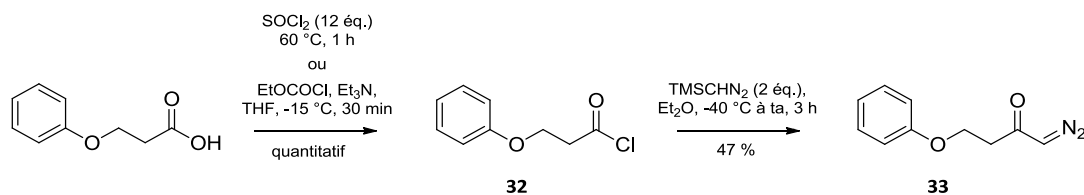


Schéma 23 : Synthèse du dérivé α -diazo-cétone **33** à partir de l'acide 3-phénoxypropanoïque.¹¹¹

Le dérivé **33** a été obtenu avec un rendement correct de près de 50 %.

Les dérivés α -diazo-cétones peuvent ensuite être décomposés en carbènes par voie thermique ou par voie photochimique (Schéma 24).

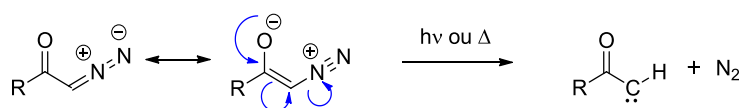


Schéma 24 : Décomposition thermique ou photochimique du dérivé α -diazo-cétone en dérivé de type carbène.

Mais il est beaucoup plus commun d'employer un métal de transition tel que le cuivre ou le rhodium pour favoriser et stabiliser la formation du carbène (Schéma 25).

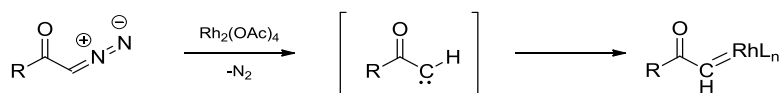


Schéma 25 : Formation de métallocarbène à partir de métaux de transition tel que le rhodium.

Les carbènes formés de cette façon sont en réalité des espèces de type carbénoïde car il s'avère qu'ils restent coordonnés avec le métal employé. D'après la littérature,⁸⁵ la réaction de Büchner met en jeu des carbènes sous forme triplet. L'addition d'un tel carbène sur un alcène est apparentée à une addition radicalaire sur une double-liaison.

La décomposition du composé α -diazo-cétone en présence de rhodium ou encore de cuivre a permis de découvrir la cyclisation intramoléculaire de Büchner dans les années 90.^{85,86} Cette cyclisation est immédiatement obtenue après l'ajout du catalyseur au rhodium (généralement l'acétate de rhodium II). L'attaque du métallocarbène sur la double liaison

⁸⁵ M. Kennedy, M. A. McKerver, A. R. Maguire, S. M. Tuladhar, F. Twohig *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1* **1990**, 1047-1054

⁸⁶ P. Manitto, D. Monti, G. Speranza *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 484-485

permet de former un intermédiaire qui conduit à une cyclopropanation intramoléculaire pour former, après réarrangement, le composé final stable.

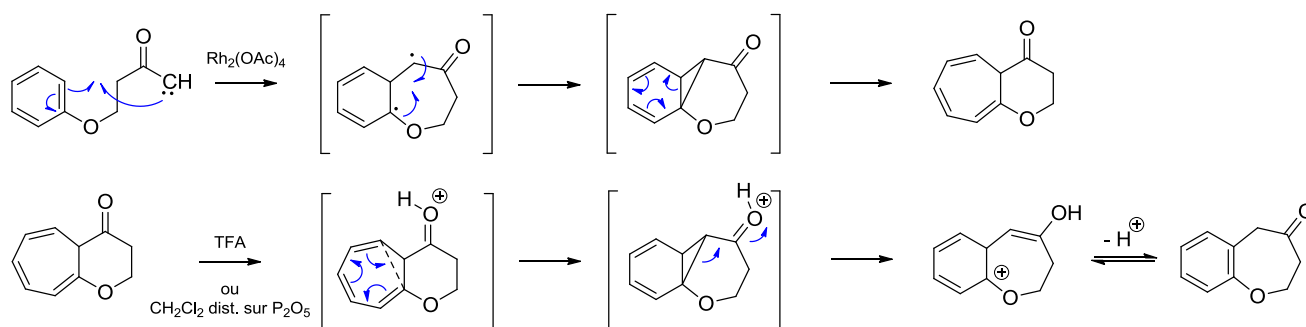


Schéma 26 : Mécanisme de cyclisation intramoléculaire de Büchner.^{85,87}

Alors que les conditions initiales proposent l'emploi du TFA,^{85,88,89} l'acidité résiduelle du CH_2Cl_2 distillé sur P_2O_5 est suffisante pour permettre le réarrangement jusqu'au produit final.

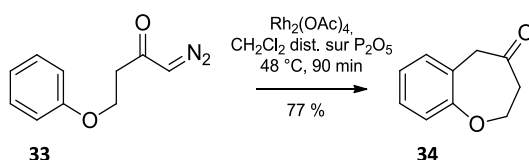


Schéma 27 : Cyclisation intramoléculaire de Büchner accédant au dérivé annellé **34**, à partir du dérivé α -diazo-cétone **33**.⁸⁵

Il est à noter que cette séquence réactionnelle a également été réalisée à partir de l'acide 4-phénylbutanoïque. L'intermédiaire cycloheptatriène a pu, dans ce cas, être isolé.

Le succès de ces réactions est très encourageant mais il demeure important de vérifier si ces conditions sont transposables au dérivé aromatique substitué qui nous intéresse (Schéma 28).

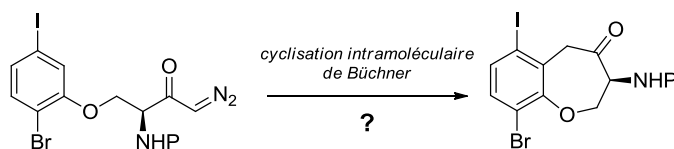


Schéma 28 : Cyclisation de Büchner souhaitée à partir d'un dérivé aromatique substitué.

⁸⁷ La cyclisation de Büchner est initialement décrite, par les auteurs, à partir de l'acide 4-phénylbutanoïque

⁸⁸ Brevet : US2009/247567 A1

⁸⁹ S. Uemura, K. Ohe, N. Sugita, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1* **1990**, 1697-1703

B. Borylation régio-contrôlée

Luliński *et al.* ont décrit en 2008, une méthode permettant d'accéder au 4-bromo-1-iodophényllithium, de manière régiosélective, par action du LTMP, une base particulièrement encombrée (Schéma 29).⁹⁰

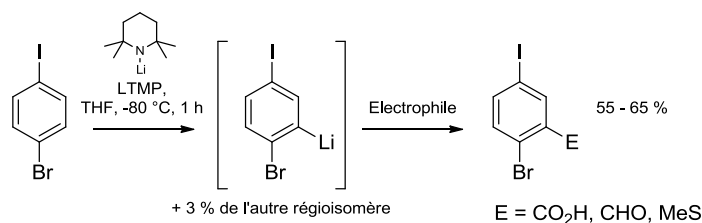


Schéma 29 : O-lithiation régiosélective du 4-bromo-1-iodobenzène.⁹⁰

Ces auteurs ont piégé, dans cette étude au départ du 4-bromo-1-iodobenzène, le dérivé lithien intermédiaire par trois électrophiles, n'incluant pas de dérivé borylé.

En suivant les conditions de lithiation préconisées par Luliński *et al.*,⁹¹ nous avons pu obtenir, après piégeage du lithien intermédiaire par $B(OiPr)_3$, le produit désiré avec une bonne régiosélectivité de 80 %. A titre comparatif, nous avons utilisé le LDA lors de l'étape de lithiation. Comme indiqué Schéma 30, cette base s'était déjà avérée efficace pour installer une partie $B(OH)_2$ en *ortho* d'un atome de brome.

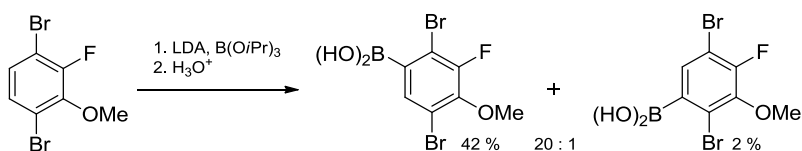


Schéma 30 : Borylation régiosélective, à partir du LDA et du $B(OiPr)_3$, sur le 4-bromo-1-iodobenzène.⁹¹

Nous avons obtenu la même régiosélectivité que précédemment. Pour des raisons pratiques, l'utilisation du LDA a finalement été préférée (Schéma 31). L'utilisation du 2-Me-THF, à la place du THF, a sensiblement amélioré les rendements de réaction, bien que ces derniers ne dépassent pas les 50 %.

⁹⁰ S. Luliński, J. Serwatowski, M. Szczerbinska *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 1797-1801

⁹¹ S. Luliński, J. Serwatowski, A. Zaczek *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 5167-5173

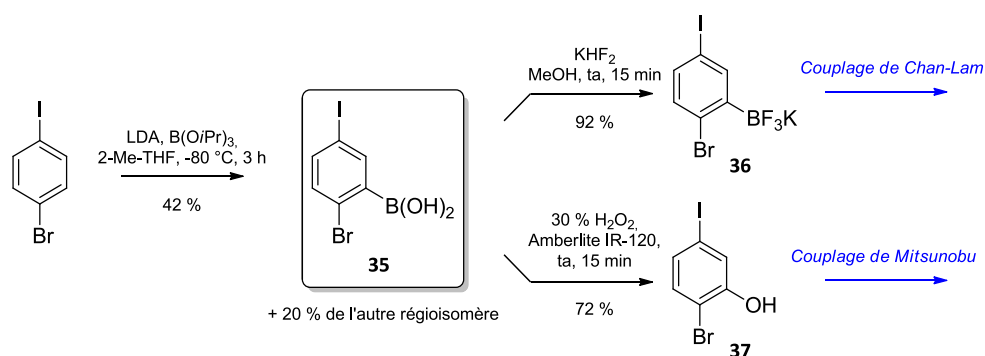


Schéma 31 : Borylation régiocontrôlée du 1-bromo-4-iodobenzène et voies d'accès aux dérivés de type « BF₃K »⁹² et « phénol ».⁹³

Ce motif aromatique trisubstitué offre désormais un large panel de couplages. Souhaitant conserver les substituants halogénés jusqu'en fin de synthèse, notre étude a porté sur ceux faisant intervenir la partie acide boronique en privilégiant les couplages de Chan-Lam et de Mitsunobu.

C. Couplage de Chan-Lam

Chan et Lam, du département de recherche de DuPont à Newark et Evans de l'Université de Cambridge, ont simultanément décrit le couplage de phénols avec des acides arylboroniques, afin d'accéder à des diaryléthers.^{94,95,96}

1. Mécanisme supposé du couplage de Chan-Lam

Initialement, Chan et Lam ont fait l'hypothèse que la première étape du mécanisme catalytique de *O*-arylation avec les acides boroniques implique une coordination et un échange de ligands rapides conduisant à l'intermédiaire **A** (Schéma 32). La seconde étape met en jeu la transmétalement de l'acide arylboronique avec ce dernier donnant lieu ainsi au complexe **B**. S'en suit une élimination réductrice après formation du complexe **C** en présence d'oxygène.

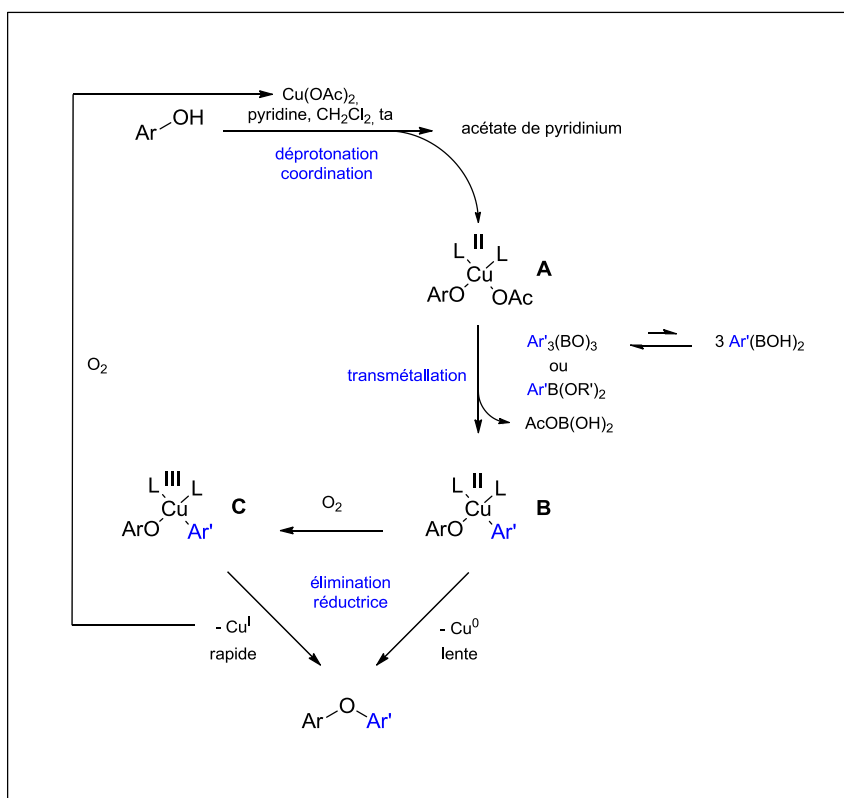
⁹² S. Darses, G. Michaud, J.-P. Genêt *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 1875-1883

⁹³ N. Mulakayala, Ismail, K. M. Kumar, R. K. Rapolu, B. Kandagatla, P. Rao, S. O. M. Pal *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53, 6004-6007

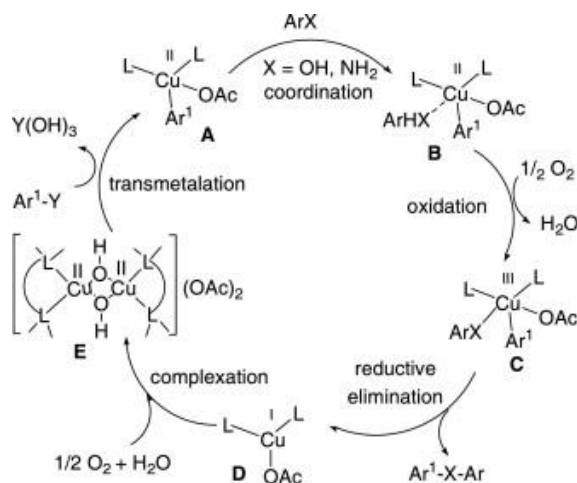
⁹⁴ D. M. T. Chan, K. L. Monaco, R.-P. Wang, M. P. Winters *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 2933-2936

⁹⁵ P. Y. S. Lam, C. G. Clark, S. Saubernt, J. Adamst, M. P. Winters, D. M. T. Chan, A. Combst *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 2941-2944

⁹⁶ D. A. Evans, J. L. Katz, T. R. West *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 2937-2940

Schéma 32 : Mécanisme catalytique supposé décrit par Chan et Lam.⁹⁷

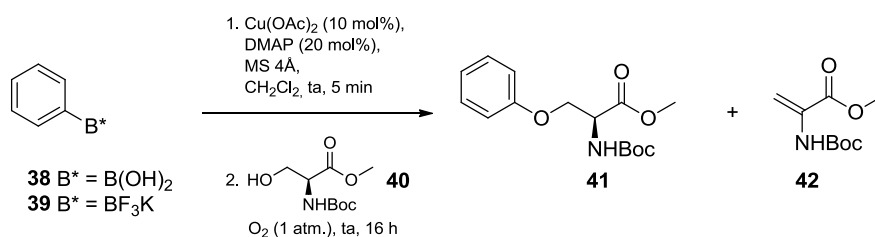
Plus récemment, Rao *et al.* ont proposé un mécanisme où la transmétallation interviendrait en premier lieu (Schéma 33).

Schéma 33 : Mécanisme catalytique du couplage de Chan-Lam proposé par Rao *et al.*⁹⁸ - Y est une espèce boryle

⁹⁷ D. T. Chan, P. Y. S. Lam, ed. By D. G. Hall, In *Recent Advances in Copper-Promoted C-Heteroatom Bond Cross-Coupling Reactions with Boronic Acids and Derivatives*; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2005**, Chap. 5 (Boronic Acids)

2. Etude du couplage de Chan-Lam à partir d'acide phénylboronique et de phényltrifluoroborate de potassium.⁹⁹

Pour cette étude préliminaire, nous avons sélectionné l'ester méthylique de la *N*-Boc-L-sérine.¹⁰⁰ Dans le but d'obtenir des rendements reproductibles, nous nous sommes attachés, pour cette série d'expériences, à fixer la vitesse d'agitation du milieu réactionnel (Tableau 12).¹⁰¹



Entrées	-B* (38 ou 39)	40	MS 4Å	40 ^a	41 ^a	42 ^a
A ^b	2 éq. 38	1 éq.	300 g/mol	> 90 %	nd	nd
B ^c	2 éq. 39	1 éq.	300 g/mol	0 %	37 %	63 %
C	1 éq. 39	2 éq.	300 g/mol	16 %	48 %	36 %
D	2 éq. 39	1 éq.	100 g/mol	35 %	29 %	36 %

^a rendement déterminé par analyse ¹H RMN du brut réactionnel

^b il est à noter que cette expérience a d'abord été menée sous air

^c il est à noter que cette expérience a d'abord été menée sous air mais la conversion en produit désiré ne dépassait pas les 10 %

Tableau 12 : Influence du composé borylé, du nombre d'équivalent des réactifs **35 ou **36** et **37** ainsi que de la charge en tamis moléculaire sur le couplage Chan-Lam.**

Quach *et al.* ont fait état de différences de rendements selon le composé borylé utilisé et ont montré qu'ils étaient inférieurs dans le cas de l'acide boronique. Ce résultat a été largement confirmé dans le cadre de notre étude, puisque le couplage à partir de l'acide boronique n'a pas permis d'obtenir le produit désiré.

⁹⁸ K. S. Rao, T.-S. Wu *Tetrahedron* **2012**, 68, 7735-7754

⁹⁹ T. D. Quach, R. A. Batey *Org. Lett.* **2003**, 5, 1381-1384

¹⁰⁰ G. Pavé, S. Usse-Versluys, M.-C. Viaud-Massuard, G. Guillaumet *Org. Lett.* **2003**, 5, 4253-4256

¹⁰¹ Vitesse d'agitation fixée à 500 rpm - cf. la partie expérimentale pour plus de précisions

Le problème majeur rencontré réside dans la formation, en quantité non négligeable, de l'acrylate **42**, résultant probablement de la dégradation de **41**,¹⁰² et cela même en diminuant la quantité de tamis moléculaire dans le milieu réactionnel.¹⁰³

La formation du produit de déshydratation **42** étant probablement liée à l'acidité du proton en alpha du groupement NHBoc, nous avons répété l'expérience à partir de l'ester méthylique de la L-sérine protégée sous la forme d'un NHTr qui possède un proton présentant un caractère moins acide que celui du groupement NHBoc comme le montre les déplacements chimiques indiqués dans le Tableau 13.¹⁰⁴

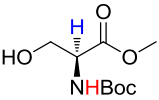
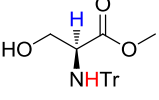
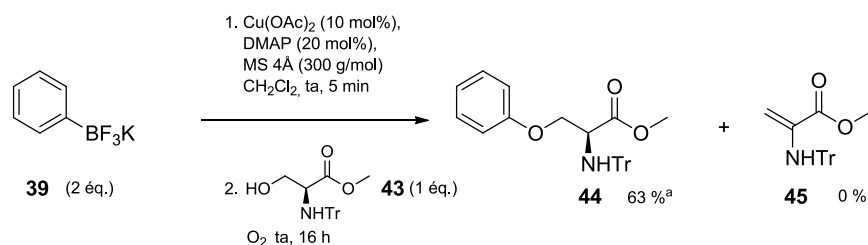
Dérivés de la L-sérine	δ -NH	δ -CH
	5,50 ppm	4,67 ppm
	2,90 ppm	3,74 ppm

Tableau 13 : Influence du groupement protecteur sur les déplacements chimiques des protons NH et CH.

Aucun produit de déshydratation **45** n'a été effectivement observé et le produit de couplage désiré a pu être obtenu avec un rendement tout à fait satisfaisant (Schéma 34).



^a rendement isolé (100 % de conversion d'après l'analyse ¹H RMN)

Schéma 34 : Couplage de Chan-Lam à partir du dérivé 2.

¹⁰² D'après l'analyse ¹H RMN, il y a formation de phénol *in situ*

¹⁰³ O. Mitsunobu *Synthesis* **1981**, 1, 1-28

¹⁰⁴ R. J. Cherney, I. Wang *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2544-2546

3. Etude du couplage de Chan-Lam à partir du dérivé 2-bromo-5-iodophényltrifluoroborate de potassium

Le produit de couplage ayant été obtenu avec succès dans le cas d'un aromatique non substitué, Il était intéressant de voir si ce couplage était applicable à l'analogue dihalogéné qui nous intéresse (Schéma 35).

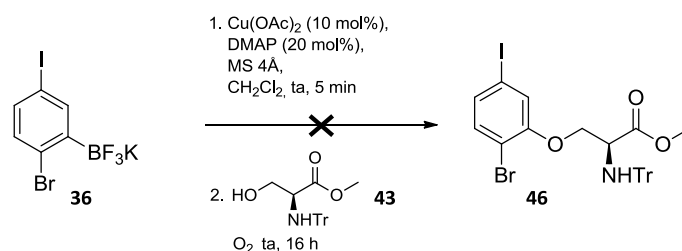


Schéma 35 : Couplage de Chan-Lam non effectif à partir du dérivé trisubstitué **36**.

Malheureusement, dans ce cas, le produit désiré n'a pu être obtenu qu'à l'état de traces (< 10 %) bien que les deux tentatives aient été réalisées en prenant toutes les précautions pour assurer un milieu anhydre. Les produits de départ constituent majoritairement le brut réactionnel (^1H RMN).

Bien que les conditions de couplage Chan-Lam aient été correctement établies dans le cas d'un dérivé aromatique non substitué, ces conditions ne semblent pas être transposables à un dérivé substitué. L'encombrement stérique causé par le brome semble largement défavoriser la réaction de couplage.

D. Couplage de Mitsunobu

Bien que le couplage de Mitsunobu ait été envisagé en premier lieu, il avait été écarté suite à quelques essais préliminaires peu encourageants réalisés dans des conditions habituelles (DIAD, PPh_3 , dérivé de la L-sérine, THF, 70 °C, 16 h)

L'étude du couplage Chan-Lam n'ayant pas été concluante, des essais de couplage de Mitsunobu ont été réitérés, cette fois-ci, dans d'autres conditions. Lepore *et al.* proposent l'utilisation d'ultrasons pour améliorer, voire permettre, dans le cas de dérivés aromatiques dits « encombrés », la réaction de couplage. Par ailleurs, une concentration élevée (1 à 3 M)

est également préconisée afin de diminuer le temps de réaction et d'améliorer le rendement.¹⁰⁵

Cette nouvelle série d'essais s'est avérée plus convaincante puisque le produit de couplage désiré a pu être obtenu avec un rendement supérieur à 40 % (Schéma 36).

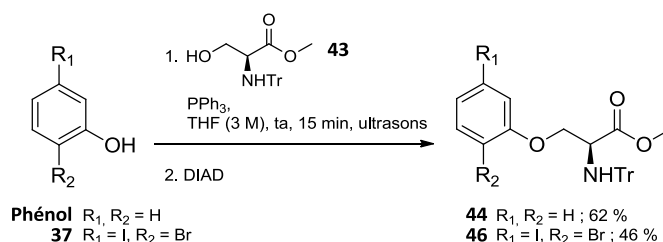


Schéma 36 : Réaction de couplage de Mitsunobu sous ultrasons, en milieu concentré.¹⁰⁵

Bien que le rendement de réaction n'avoisine que les 50 %, ce résultat est doublement satisfaisant. D'une part, il s'agit d'une réaction très reproductible (plus de 5 essais ont été réalisés), facile à mettre en œuvre. D'autre part, bien que le rendement de couplage soit éloigné des résultats de la littérature (ca. 80 % pour des dérivés aromatiques et alcooliques encombrés stériquement), nous n'avons observé aucun produit de dégradation et les produits de départ peuvent être aisément réengagés.

E. Réaction de Arndt-Eistert

La réaction de Arndt-Eistert permet, à ce stade, d'accéder au dérivé α -diazo-cétone. Cette réaction est classiquement décrite en employant le diazométhane CH₂N₂ (Schéma 37).

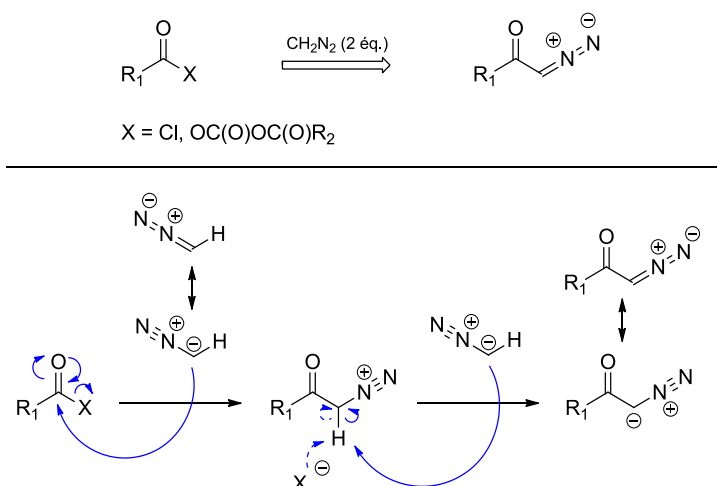


Schéma 37 : Mécanisme général de la réaction de Arndt-Eistert.¹⁰⁶

¹⁰⁵ S. D. Lepore, Y. He *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8261-8263

Le diazométhane présentant un caractère explosif, il est recommandé de travailler avec son analogue TMSCHN₂ moins dangereux.¹⁰⁷

1. Obtention du dérivé diazocétone directement à partir de l'ester méthylique 44

Dans le cas des lactones, la réaction de Arndt-Eistert a aussi été décrite, mais elle nécessite l'emploi du dérivé lithié, plus réactif, TMSCLiN₂ (Schéma 38).¹⁰⁸

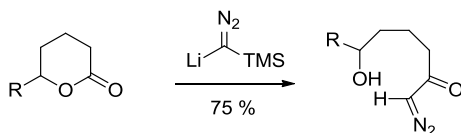


Schéma 38 : Exemple de réaction de Arndt-Eistert sur une lactone, à partir de TMSCLiN₂.¹⁰⁸

A partir d'esters méthyliques, la réaction n'a pas été décrite, à notre connaissance. Elle conduit par contre à des dérivés tétrazoles comme indiqué Schéma 39.

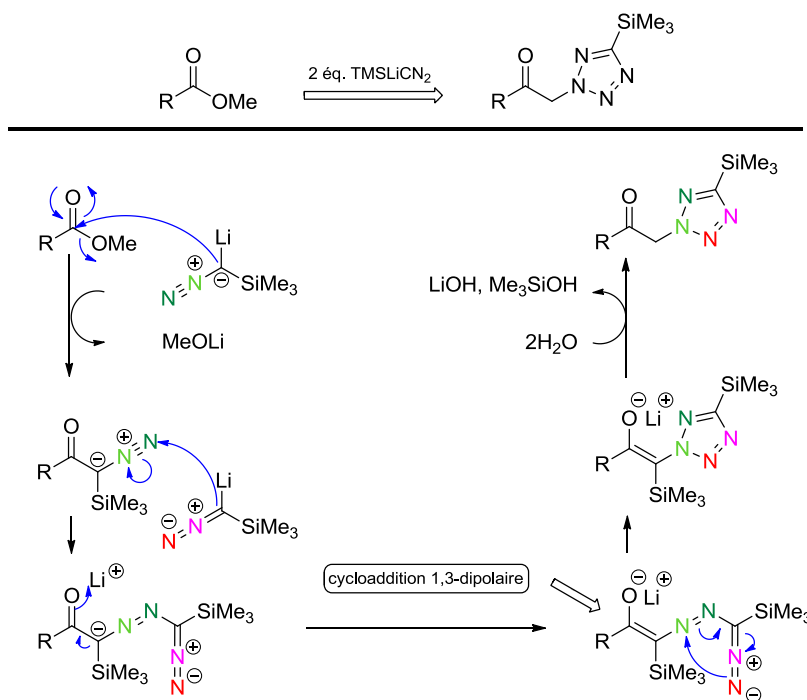


Schéma 39 : Mécanisme de formation du noyau tétrazole à partir d'un ester méthylique.^{109,110}

¹⁰⁶ C. Huggett, R. T. Arnold, T. I. Taylor *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, 64, 3034

¹⁰⁷ T. Aoyama, T. Shioiri *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 2005-2006

¹⁰⁸ J. M Davies, C. J. Moody, R. J. Taylor *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 1, 1-7

¹⁰⁹ T. Aoyama, T. Shioiri *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, 30, 3450-3452

Lors d'une expérience préliminaire, nous avons pu confirmer la formation majoritaire du dérivé tétrazole **48** au départ de l'ester méthylique **44** après traitement avec 2 éq. de TMSCHN₂ (Schéma 40).

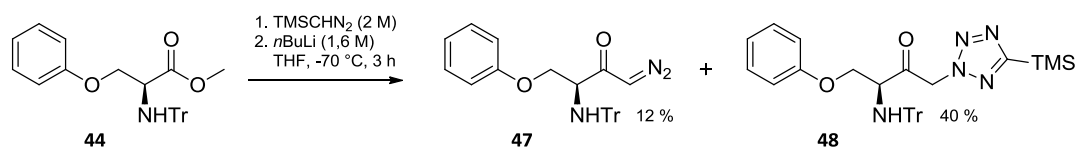


Schéma 40 : Réaction d'Arndt-Eistert sur le dérivé **44**, à partir de TMSCHN₂ préparé *in situ*.

Malgré tout, nous avons pu isoler, en faible quantité, le produit diazo issu de la réaction de Arndt-Eistert. Trois autres essais réalisés, en faisant varier la température et le nombre d'équivalent en TMSCHN₂, ont confirmé la formation très majoritaire du dérivé tétrazole.

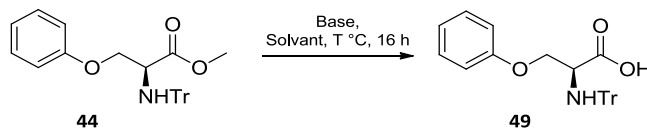
Nous avons alors voulu tester la réaction de Arndt-Eistert avec TMSCHN₂ dans des conditions classiques, c'est-à-dire au départ d'un chlorure d'acide ou d'un anhydride mixte.¹¹¹ La synthèse de ces composés implique l'obtention de l'acide carboxylique correspondant par saponification de l'ester méthylique **44**.

¹¹⁰ C. J. Moody, C. W. Rees *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 2, 323-327

¹¹¹ J. Cesar, M. S. Dolenc *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 7099-7102

2. Saponification de l'ester méthylique **44**

Contre toute attente, la saponification de l'ester **44** s'est avérée très problématique comme le montre le Tableau 14.



Entrées	Ref	Base	Solvant 50 : 50	Température	44 ^a	49 ^a
A	/	NaOH	H ₂ O : THF	ta puis 70 °C	100 %	0
B	/	KOH	H ₂ O : THF	ta puis 70 °C	100 %	0
C	¹¹²	KOH/MeOH	MeOH : Dioxane	ta, 50 °C et 100 °C	100 %	0
D	¹¹³	LiOH	H ₂ O : THF	0 °C, ta puis 70 °C	100 %	0
E	¹¹⁴	LiOH	H ₂ O ₂ (30 %) : Dioxane	100 °C	100 %	0
F	¹¹⁵	LiOH	H ₂ O ₂ (30 %) : MeOH	70 °C	100 %	0
G ^b	¹¹⁶	LiOH	H ₂ O : Dioxane	100 °C	0	100 % (72 %) ^{c,d}

^a rendement déterminé par analyse ¹H RMN du brut réactionnel

^b 96 h de temps de réaction

^c rendement isolé

^d expérience non reproductible

Tableau 14 : Tentatives de saponification de l'ester méthylique du dérivé **44.**

Tous les essais réalisés, faisant varier la base utilisée, le solvant et la température, n'ont abouti qu'à la récupération du produit de départ (entrée **A-F**). Ce n'est qu'en utilisant les conditions préconisées par Hurt *et al.* que nous avons pu isoler, lors d'un essai, le produit désiré avec un rendement correct (entrée **G**). Nous n'avons pas pu reproduire cette saponification certainement en partie à cause du traitement réactionnel délicat.

¹¹² L. Zervas, D. M. Theodoropoulos *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 1359

¹¹³ V. V. Sureshbabu, N. Narendra, ed. by A. B. Hughes, In *Medicinal Chemistry, Combinatorial Synthesis*; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2011**, Vol. 4, p. 35-36

¹¹⁴ R. P. Sellers, L. D. Alexander, V. A. Johnson, C.-C. Lin, J. Savage, R. Corral, J. Moss, T. S. Slugocki, E. K. Singh, M. R. Davis, S. Ravula, J. E. Spicer, J. L. Oelrich, A. Thornquist, C.-M. Pan, S. R. McAlpine *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 6822-6856

¹¹⁵ M. R. Davis, E. K. Singh, H. Wahyudi, L. D. Alexander, J. B. Kunicki, L. A. Nazarova, K. A. Fairweather, A. M. Giltrap, K. A. Jolliffe, S. R. McAlpine *Tetrahedron* **2012**, *68*, 1029-1051

¹¹⁶ C. R. Hurt, R. Lin, H. Rapoport *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 225-233

D'autres groupements protecteurs de la fonction amine ont par la suite été envisagés afin de tester si la saponification pouvait s'effectuer plus facilement. Nous avons privilégié des groupements moins encombrants que le trityle, de type carbamate d'éthyle comme présenté Schéma 41.

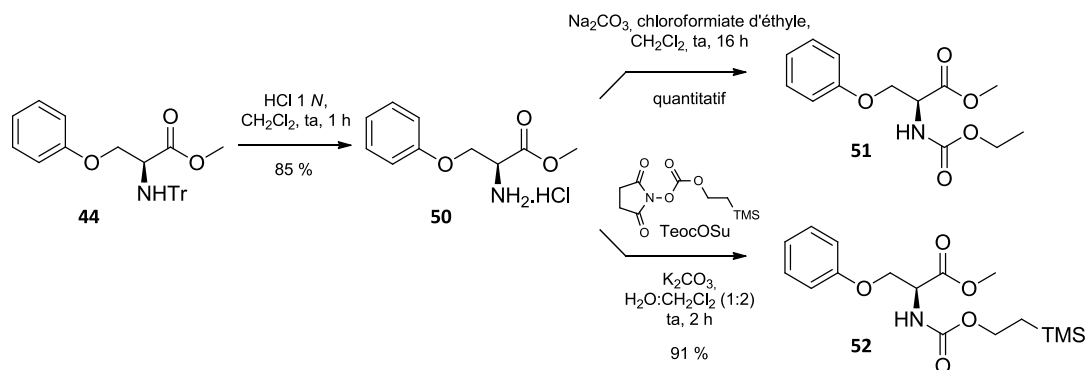


Schéma 41 : Changement des groupements protecteurs à partir du dérivé **44**.

Le groupement trityle a pu être hydrolysé aisément en milieu acide. Les nouveaux dérivés protégés **51** et **52** ont été également obtenus avec d'excellents rendements.

Nous disposons, à présent, de deux précurseurs **51** et **52** d'acides carboxyliques qui mériteraient d'être testés en vue de l'obtention des dérivés diazo correspondant. Malheureusement, faute de temps, cette étude n'a pu être réalisée.

IV. Conclusion

Trois voies de synthèse ont été étudiées pour accéder à l'inhibiteur picomolaire **1a**.

La voie de synthèse originelle en série racémique était celle considérée comme la plus efficace. Il restait, néanmoins, important d'améliorer plusieurs étapes notamment la réaction de dibromation radicalaire (précurseur du dérivé bicyclique **5**), l'étape clé de formation de l'éther d'énol silylé **6** et la séquence réactionnelle permettant d'accéder au chlorhydrate d'ammonium **1a** final. Elle présente, cependant, encore de nombreux désavantages (Schéma 42).

1. 20 étapes longues et fastidieuses
2. régioisomères difficilement séparables
3. réaction de Sandmeyer peu reproductible
4. étapes de protection/déprotection rallongeant la synthèse
5. accès à un mélange racémique

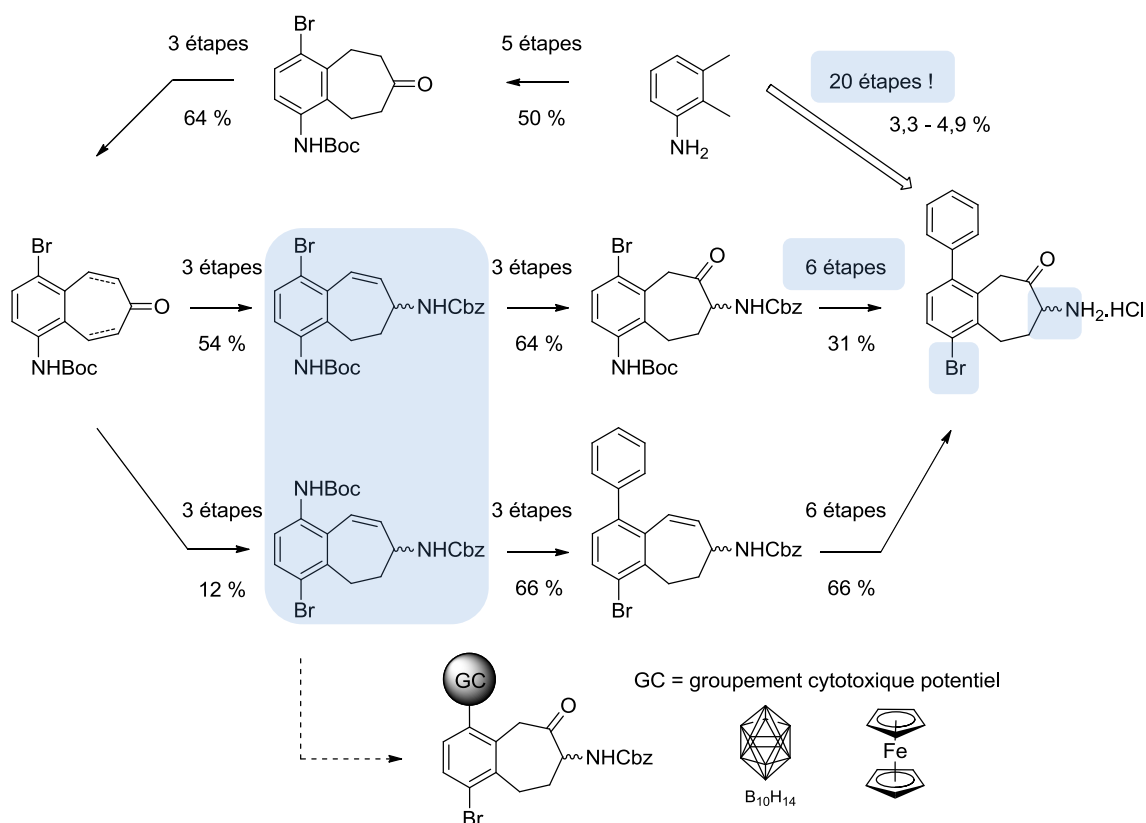


Schéma 42 : Principaux inconvénients de la voie de synthèse « n°1 ».

Toutefois, il a été démontré que la voie de recyclage, bien qu'elle ne représente que 1,6 % du rendement final, était très facile à mettre en œuvre. Elle sera donc utilisée pour introduire des groupements à cytotoxicité potentielle. Cette partie sera décrite dans le chapitre III qui suit.

Une autre voie en série racémique, proposant 12 étapes, passant par des intermédiaires homodisubstitués et mettant en jeu un couplage de Suzuki-Miyaura régio-contrôlé, a également été envisagée. Chronologiquement parlant, cette stratégie a été étudiée avant de connaître la nature (S) du centre stéréochimique en position 7. Elle n'est plus adaptée, non seulement car elle aboutit à un mélange racémique mais elle présente également des difficultés de mise en œuvre. Toutefois, certaines étapes réactionnelles méritent d'être retenues, notamment la synthèse du 2,3-dibromoxylène ainsi que la formation originale de l'intermédiaire α -énone directement à partir de l'éther d'énol silylé. Ces dernières pourraient, en effet, être utilisées pour raccourcir et améliorer la synthèse de l'analogue 1,4-dibromo-amino-benzosubérone **1a**.

Enfin, bien qu'inachevée, la troisième voie de synthèse est sans doute la plus intéressante. L'approche par synthons - le dérivé d'acide aminé d'une part et l'aromatique trisubstitué d'autre part, précédant le couplage dans des conditions de type Mitsunobu originales - offre une perspective de synthèse à l'échelle du multigramme plus évidente que dans les synthèses précédentes. Bien que sa faisabilité n'ait pas été entièrement démontrée, notre étude préliminaire tend à la valider. En plus de comporter un nombre d'étapes réduit, elle présente l'avantage d'accéder à une diversité de produit grâce au couplage de type Suzuki-Miyaura sélectif en toute fin de synthèse. Par ailleurs, l'introduction d'un hétéroatome comme l'oxygène, devrait améliorer la biodisponibilité de la molécule finale. Enfin, cette voie de synthèse devrait permettre, pour la première fois, d'accéder à des dérivés énantiomériquement purs.

CHAPITRE III

Synthèse et évaluation biologique de dérivés ferrocéniques

Depuis plusieurs décennies, les composés organométalliques suscitent un intérêt grandissant dans le développement de nouvelles thérapies pour lutter contre le cancer ou encore les maladies tropicales e.g. la malaria.

Grâce à sa grande stabilité et à sa lipophilie, le ferrocène entre dans cette nouvelle classe de composés. Ses possibilités réactionnelles étendues combinées à ses remarquables propriétés électrochimiques donnent lieu à des molécules nouvelles aux propriétés biologiques étonnantes.

Dans ce chapitre, nous avons brièvement retracé son histoire et les découvertes qui mettent en avant les propriétés anti-cancéreuses de certains dérivés du ferrocène.

*Modifier une molécule présentant déjà d'intéressantes propriétés thérapeutiques en y incorporant un groupement ferrocényle est une stratégie adoptée par des laboratoires du monde entier. Ayant développé la molécule la plus puissante vis-à-vis de l'APN, notre équipe a également souhaité exalter ses impressionnantes propriétés inhibitrices en créant des molécules à activité duale : inhibitrice de l'APN et cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales. La synthèse de ces composés ferrocényles sera décrite dans ce chapitre ainsi que l'évaluation de leurs effets envers les deux cibles précédemment évoquées : l'APN (porcine et d'*Escherichia coli*) et les cellules HT1080 (fibrosarcome).*

Chapitre III : Synthèse et évaluation biologique de dérivés ferrocéniques

I. Le Ferrocène

A. Une révolution dans la chimie organométallique

Bien que, dès les années 20, certains chimistes industriels allemands aient déjà observé un dépôt orange lorsque du cyclopentadiène gazeux circulait dans des canalisations en fer, ce n'est que 30 ans après, qu'une structure du ferrocène est publiée pour la première fois par Pauson & Kealy dans la revue *Nature*.¹¹⁷ Il s'agissait d'une découverte fortuite car, initialement, ils souhaitaient synthétiser le fulvalène à partir du bromure de magnésium de cyclopentadiényle et du chlorure ferreux. Toutefois, le modèle proposé par ces auteurs était celui d'un complexe σ . L'année suivante, Wilkinson & Woodward et, indépendamment, Fisher *et al.* ne révolutionnèrent pas uniquement la chimie organométallique mais toute la chimie organique, en introduisant une structure inédite dite en « sandwich » impliquant un complexe π (Figure 32)¹¹⁸. Cette extraordinaire découverte leur a valu le Prix Nobel de Chimie en 1973. Contrairement au complexe σ cette nouvelle formule du ferrocène permet d'expliquer sa très haute stabilité thermique (> 400 °C).

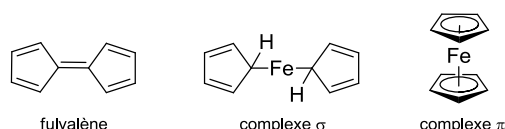


Figure 32 : Vers la structure du ferrocène.

La découverte du ferrocène fascine les chimistes de l'époque car ce composé met en jeu un nouveau type de liaison totalement inconnu en chimie organique classique. C'est l'avènement d'une nouvelle ère de la chimie organométallique et le développement de la chimie moléculaire des métaux de transitions. S'en suivront de nombreux travaux de recherche sur d'autres métaux de transition, donnant naissance à une nouvelle famille de composés : les métallocènes.

¹¹⁷ T. J. Kealy, P. L. Pauson *Nature*, **1951**, 168, 1039

¹¹⁸ G. Wilkinson, M. Rosenblum, M. C. Whiting, R. B. Woodward *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, 74, 2125-2126

B. Sa structure moléculaire et ses propriétés électroniques

Le ferrocène est un solide orange très stable à l'air avec un point de fusion de 173 °C. Il possède un moment dipolaire nul, ce qui explique sa solubilité dans une majorité de solvants organiques et non dans l'eau.

Les atomes de carbone sont équidistants du métal (2,05 Å) et également entre eux (1,43 Å)¹¹⁹. La barrière de rotation autour de l'axe métal-cycle est très faible (4 kJ.mol⁻¹) et résulte essentiellement des forces de Van der Waals entre les deux cyclopentadiényles.

Le ferrocène est un complexe organométallique dans lequel le métal de transition de degré d'oxydation +II (ici Fe²⁺), est lié à deux cycles pentadiényles (Cp²⁻) disposés parallèlement. Il peut adopter deux conformations isoénergétiques : l'une décalée du groupe de symétrie D_{5d} (a), l'autre éclipée du groupe de symétrie D_{5h} (b) (Figure 33).

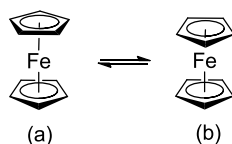


Figure 33 : Conformation décalée (a) et éclipée (b) du ferrocène.

La construction du diagramme moléculaire en symétrie D_{5h} nous renseigne sur ses principales caractéristiques électroniques et spectroscopiques.

Les 18 électrons des OM du complexe Fe(Cp)₂ sont tous appariés ; cela fait du ferrocène un composé diamagnétique. Les électrons des OA *s* et *p* de Fe(II) n'interviennent pas ou peu dans les OM liantes. Seules les orbitales *d* de Fe(II) sont impliquées dans la formation du complexe « métal - cycle » et plus particulièrement l'OM *a*_{1g} liante (ici la HOMO) depuis les OA *e*_{1g}. Les OM *e*^{*}_{1g} anti-liantes correspondantes (ici la LUMO) est vacante à son état fondamental mais peut être engagée dans des états de transitions excités.

¹¹⁹ D. E. Bean, P. W. Fowler, M. J. Morris *J. Organomet. Chem.* **2011**, 696, 2093-2100

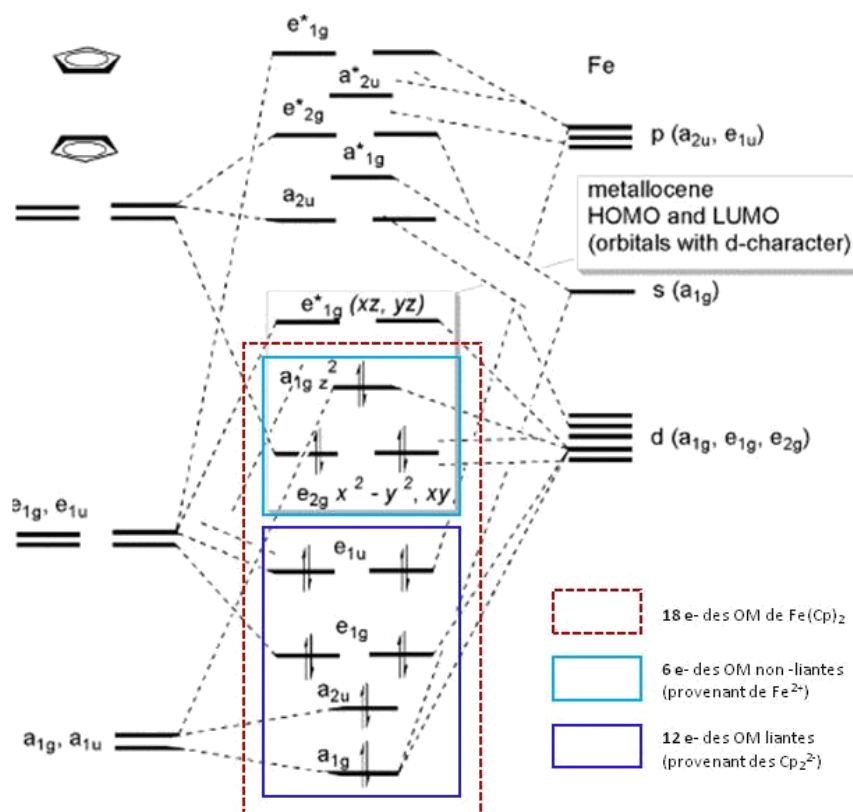


Figure 34 : Diagramme de corrélation des OM occupées par des électrons (sauf LUMO) du ferrocène en symétrie D_{5d} .^{120,121}

La présence d'électrons non liants à ce haut niveau d'énergie d'OM explique le comportement rédox et la plupart de ses propriétés chimiques. La faible différence d'énergie entre la HOMO et la LUMO est responsable du caractère aromatique des cycles pentadiényles et permettent ainsi des substitutions électrophiles aisées.^{122,123,124} C'est de ces orbitales qu'un électron peut facilement être arraché, générant ainsi des espèces ferriciniums - cation radical (Schéma 43). L'appariement des électrons n'étant plus établi, l'espèce oxydée est alors paramagnétique.

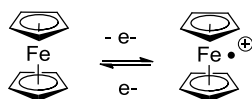


Schéma 43 : Transfert d'1 électron du couple ferrocène / ferricinium.

¹²⁰ P. Debroy, S. Roy *Coord. Chem. Rev.* **2007**, 251, 203-221

¹²¹ A. J. Atkins, M. Bauer, C. R. Jacob *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, 15, 8095-8105

¹²² S. Barlow, H. E. Bunting, C. Ringham, J. C. Green, G. U. Bublitz, S. G. Boxer, J. W. Perry, S. R. Marder *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 3175-3723

¹²³ J. C. Calabrese, L. T. Cheng, J. C. Green, S. R. Marder, W. Tam *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7227-7232

¹²⁴ D. R. Kanis, M. A. Ratner, T. J. Marks *Chem. Rev.* **1994**, 94, 195-242

Les OM non liantes sont pratiquement toutes occupées par des électrons provenant de ceux du fer. Cette configuration électronique explique la protonation aisée du métal en milieu acide. En présence d'acides forts, le cycle cationique très faiblement lié au fer se trouve rapidement éliminé conduisant à la destruction totale du complexe (Schéma 44). Malheureusement, la littérature ne nous fournit, à notre connaissance, aucun exemple concret de produits de dégradation formés.

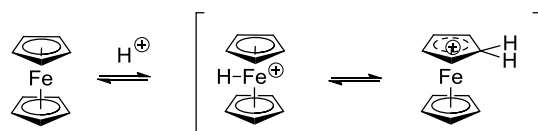


Schéma 44 : Protonation du ferrocène.

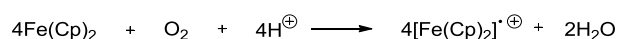
La construction du diagramme moléculaire du ferrocène en symétrie D_{5h} varie uniquement par une inversion des OM a_{1g} et e_{2g} . Ainsi la HOMO ne sera pas occupée par deux mais quatre électrons.

Il est à noter, à ce stade, que le diagramme présenté ne concerne que le ferrocène lui-même. Dès lors qu'il est substitué, le diagramme de corrélation des orbitales moléculaires est complètement modifié.

C. Son comportement vis-à-vis de l'oxygène et ses propriétés redox

La possibilité que le fer, en tant que métal de transition, puisse réagir avec l'oxygène peut être considérée comme une des propriétés fondamentales du ferrocène. Celle-ci est à rapprocher du principe même du transport de l'oxygène dans le sang qui repose complètement sur la complexation de l'oxygène sur le fer de la partie hème de l'hémoglobine. Cependant, bien que la chimie du ferrocène soit largement étudiée, peu d'informations sur ses réactions d'oxydation sont disponibles dans la littérature.

Comme il a été mentionné plus tôt dans cette partie (cf. p. 104) le ferrocène est connu pour être stable en présence d'oxygène à température ambiante, toutefois son oxydation reste possible en présence d'un acide fort de Brönsted (HX) selon l'équation suivante :



Un mécanisme d'oxydation a été proposé comme indiqué ci-après (Schéma 45).

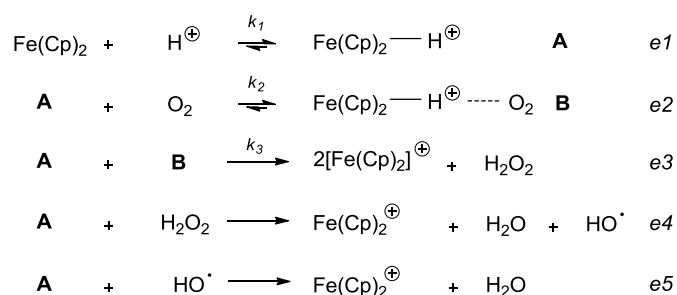


Schéma 45 : Mécanisme d'action d'oxydation du ferrocène en présence d'un acide fort de type Brönsted.¹²⁵

La protonation avec les acides forts se fait avec une vitesse k_1 élevée : l'équilibre est donc rapidement atteint (*e1*). Sous cette forme protonée, l'oxydation du ferrocène est alors possible (*e2*). Les espèces **A** et **B** semblent être à l'origine de la formation d'eau oxygénée. En effet, la faible énergie de la liaison Fe-H de 209 kJ.mol⁻¹ permet à la molécule **A** d'être un donneur d'hydrogène à la molécule de dioxygène (*e3*).

L'eau oxygénée ainsi formée, donne lieu à des radicaux hydroxyles (*e4*) qui sont les principaux responsables des effets délétères sur la cellule et confèrent donc au ferrocène ses propriétés cytotoxiques.

L'inertie du ferrocène,¹²⁶ vis-à-vis de l'oxygène, est essentiellement liée au potentiel redox standard du couple {E° (Fc⁺/Fc) 0,59 V}¹²⁷ qui est bien supérieur à celui de l'oxygène {E° (O₂⁻/O₂) -0.56 V}.¹²⁸ En revanche, lorsque ce dernier est en milieu acide fort, son potentiel atteint 1,23 V, ce qui rend la réaction thermodynamiquement plausible.

Depuis sa découverte, le ferrocène suscite l'intérêt d'une communauté scientifique très diversifiée. Ses propriétés électroniques nouvelles ainsi que la possibilité de le fonctionnaliser facilement offrent de nombreuses possibilités dans des domaines parfois très éloignés tels que la catalyse, l'aéronautique ou le biomédical.

¹²⁵ M. Mautner *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2830-2834

¹²⁶ V. M. Fomin, A. E. Shirokov, N. G. Polyakova *Russ. J. Gen. Chem.* **2008**, *78*, 1361-1370

¹²⁷ M. Castagnova, B. Floris, G. Illuminaty, G. Ortaggi *J. Organomet. Chem.* **1973**, *60*, 17

¹²⁸ M. C. Day, J. Selbin *Theoretical Inorganic Chemistry* **1976**, 330-337

D. La réactivité du ferrocène et ses limites

C'est en testant la réactivité du ferrocène que les lauréats du Prix Nobel de Chimie de 1973 comprirent très vite qu'elle était comparable à celle des dérivés benzéniques. De cette observation a émergé l'idée que le ferrocène devait probablement respecter la règle d'aromaticité de Hückel.

Outre les similitudes avec la chimie du benzène, le ferrocène présente une réactivité plus grande qu'un dérivé aromatique « classique » ; il est d'ailleurs qualifié d'« aromatique activé ». A titre d'exemple, la réaction de Friedel & Crafts d'acétylation du ferrocène (Schéma 46) présente l'avantage d'être une substitution électrophile aromatique qui ne nécessite pas l'usage d'un acide de Lewis ou autre catalyseur complexe.

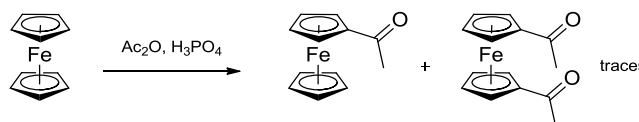
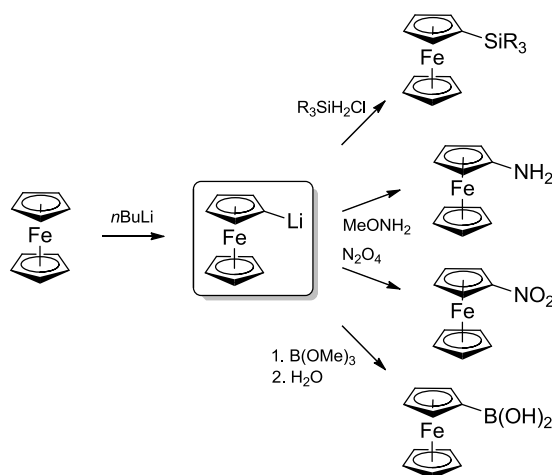


Schéma 46 : Acétylation du ferrocène.

La réaction de lithiation est, elle aussi, couramment employée dans la chimie du ferrocène, elle permet d'accéder à de nombreux dérivés dont quelques voies réactionnelles sont présentées ci-après (Schéma 47).

Schéma 47 : Lithiation du ferrocène et exemples de modification en monosubstitution.¹²⁹

La chimie du ferrocène étant très étendue, référencer l'ensemble des possibilités réactionnelles représenterait un volume conséquent. Toutefois elle présente quelques

¹²⁹ Thèse de doctorat : Dr Natascha Chavain *Conception, synthèse, analyse structurale et activité antipaludique de dérivés de la ferroquine : investigation des mécanismes d'action* 29 septembre 2008, UL1

limites qui sont souvent peu abordées dans la littérature. Dans le cadre d'une stratégie de synthèse d'un éther de ferrocène, il peut être intéressant d'aborder les voies d'accès de l'intermédiaire hydroxyferrocène décrites pour la première fois en 1959 par Nesmeyanov *et al.* (Schéma 48).¹³⁰

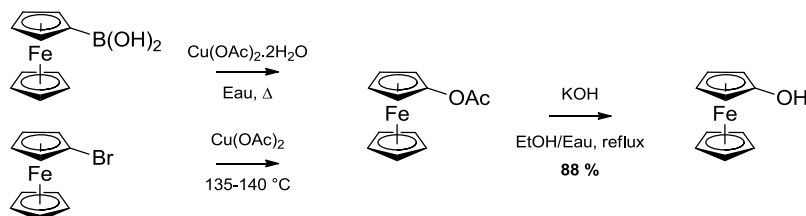


Schéma 48 : Voies d'accès à l'hydroxyferrocène à partir de l'acide boronique ou du dérivé halogéné correspondant.¹³¹

A partir de l'acide boronique du ferrocène et en présence de l'acétate de cuivre II, le dérivé acétate est facilement obtenu. Ce dernier peut être d'ailleurs à la base de nombreux autres dérivés monosubstitués du ferrocène. Le dérivé acétate est également accessible depuis le bromoferrocène, par chauffage en présence d'acétate de cuivre. L'hydroxyferrocène est alors obtenu classiquement par hydrolyse basique au reflux d'un mélange éthanol-eau.

C'est un solide jaune extrêmement sensible à l'air et ayant un pKa légèrement inférieur à celui du phénol. Contrairement au dérivé aminoferrocène (Schéma 47), l'hydroxyferrocène et par extension les dérivés de type éther ne sont pas ou peu stables.¹³² L'instabilité de l'hydroxyferrocène par voie enzymatique était également observée par Hanzlik *et al.*¹³³

L'hydroxylation enzymatique, impliquant le cytochrome P-450, de dérivés aromatiques est un processus d'une importance vitale pour la métabolisation de substances endogènes ou xénobiotiques. Au même titre que certains dérivés phénoliques, l'hydroxyferrocène peut être un métabolite biologique et se dégrade *in vivo* (Schéma 49).

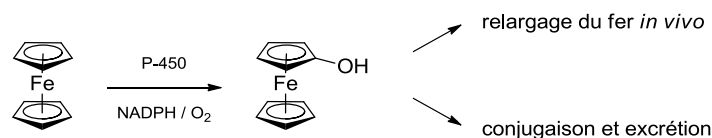


Schéma 49 : Devenir du ferrocène et de son métabolite, l'hydroxyferrocène, dans l'organisme.

¹³⁰ A. N. Nesmeyanov, V. A. Sazonova, V. N. Drozd *Tetrahedron Lett.* **1959**, 1, 13-15

¹³¹ P. Stepnicka, 1st ed., In *Ferrocenes : Ligands, Materials and Biomolecules*; Wiley-Blackwell, **2008**

¹³² D'après Nesmeyanov, l'hydroxyferrocène se dégrade au bout de quelques jours - aucune information quant au(x) produit(s) de dégradation - résultat non publié

¹³³ R. P. Hanzlik, W. H. Soine *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 1290-1291

Le mécanisme suggéré par Fomin *et al.*,¹²⁶ inspiré des voies métaboliques, est le seul, à notre connaissance, existant dans la littérature. Il explique la réactivité des dérivés hydroxyferrocènes vis-à-vis de l'oxygène de l'air (Schéma 50).

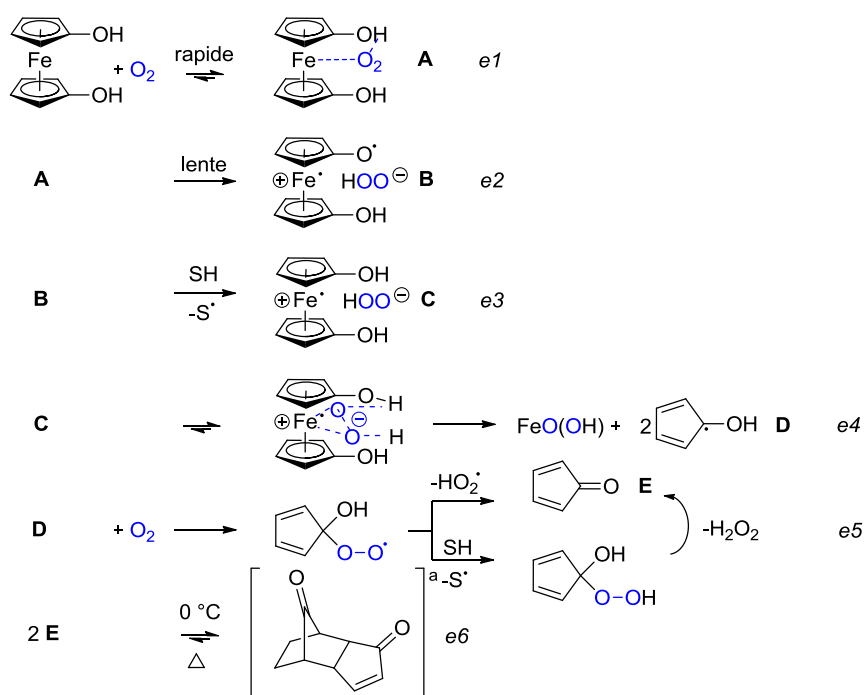


Schéma 50 : Devenir du 1,1-dihydroxyferrocène en présence d'oxygène.¹²⁶

La liaison Fe-O₂ du complexe **A** est similaire à une liaison de type « métal-ligand » mais de faible énergie (e1). La formation du dérivé cation radical **B** est lente (e2) mais par réaction radicalaire avec une espèce donneuse d'hydrogène (SH) présente dans le milieu, le groupement hydroxyle est régénéré (e3). Des liaisons métal-oxygène et hydrogène s'établissent entre le fer de **C**, le dioxygène et les groupements hydroxyles : le ferrocène est alors désintégré pour libérer l'oxyhydroxyde de fer (III) et deux molécules radicales pentacycliques **D** (e4). Le dioxygène est reformé à partir de l'espèce ferrique et réagit avec **D** pour former *in fine* l'espèce **E** (e5) avec libération de peroxyde d'hydrogène le cas échéant. Enfin deux molécules **E** peuvent dimériser conduisant à un dérivé bicyclique via une réaction thermoréversible « Diels-Alder Type Cross Linking » (e6).¹³⁴ Bien que la manipulation de ces

¹³⁴ Brevet : US8258254

composés ne soit pas aisée quelques études ont néanmoins été développées pour accéder aux dérivés de type éther (Schéma 51).¹³⁵

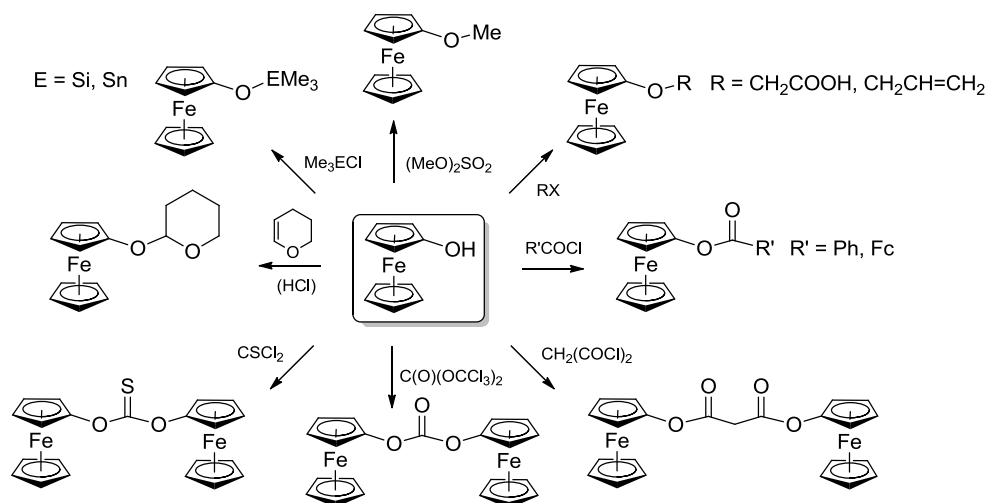


Schéma 51 : Formation de dérivés de type éther à partir de l'hydroxyferrocène.¹³⁵

Avec des équipements adaptés et de la verrerie appropriée, certains de ces dérivés sont non seulement isolés et caractérisés mais peuvent également être conservés longtemps.^{136,137,138,139,140}

¹³⁵ A. Togni, T. Hayashi, 1st ed., In *Ferrocenes : Homogeneous Catalysis, Organic Synthesis, Materials Science*; Wiley VCH Verlags gesellschaft: Weinheim & VCH Publisher: New York, **1995**

¹³⁶ S. Akabori, M. Sato, S. Ebine *Synthesis* **1981**, 278-279

¹³⁷ E. T. Singewald, C. A. Mirkin, C. L. Stern *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1624

¹³⁸ M. Herberhold, H.-D. Brendel, A. Hofmann, B. Hofmann, W. Milius *Journal of Organometallic Chemistry* **1998**, 556, 173-187

¹³⁹ J. C. Anderson, A. J. Blake, J. C. Arnall-Culliford *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 3586

¹⁴⁰ D. Schaarschmidt, H. Lang *Organometallics* **2010**, 29, 4196-4198

E. Le ferrocène, un motif de choix pour la synthèse de ligands

Un domaine plus vaste de la chimie du ferrocène et qui mérite, même succinctement, d'être abordé, est la catalyse et plus particulièrement la synthèse de ligands. Encore une fois, la diversité qu'offre la synthèse de ligands, comportant un motif ferrocène, est importante. L'exemple de ligand le plus couramment rencontré dans la littérature est le 1,1'-bis(diphénylphosphino)ferrocène - dppf (Figure 35).

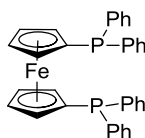


Figure 35 : Le 1,1'-bis(diphénylphosphino)ferrocène - dppf.

Dans le continuum des dérivés ferrocéniques éthérés, l'exemple qui suit (Figure 36) démontre une nouvelle fois l'intérêt de la réversibilité du caractère redox du ferrocène.

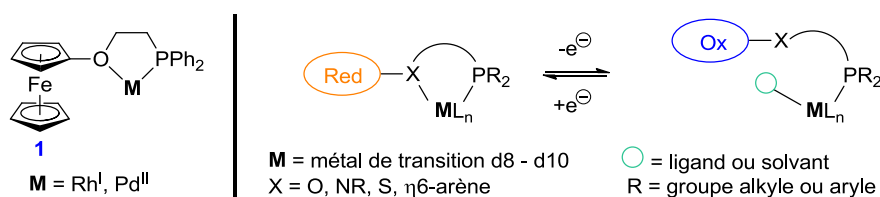


Figure 36 : Ligand de type RHL (*Redox-switchable Hemilabile Ligand*) et son mode d'action.¹⁴¹

Le dérivé **1** est un RHL (*Redox-switchable Hemilabile Ligand*) ; ligand multidenté avec généralement deux centres de liaison possédant des affinités différentes avec le métal de transition. L'un des centres (ici le motif phosphine) est inerte et maintient une liaison forte avec le métal. Alors que le deuxième centre (ici l'oxygène) est labile et forme une interaction plus faible rendant possible les échanges avec de meilleurs ligands donneurs d'électrons. La partie clé d'un ligand RHL, est la connexion d'un groupement électro-attracteur *e.g.* le ferrocène avec le centre labile. L'oxydation de la partie redox fragilise nettement l'interaction O-M et peut dans certains cas rompre la liaison Fc-O.

Dans le cas de complexes métalliques cationiques formés à partir de RHL neutres (Schéma 52), cet effet peut être exalté lorsque l'oxydation du groupement redox génère un centre cationique. De ce fait, s'établit une répulsion électronique entre le métal et le centre cationique nouvellement formé.

¹⁴¹ A. M. Allgeier, C. S. Slone, C. A. Mirkin, L. M. Liable-Sands, G. P. A. Yap, A. L. Rheingold *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 550-559

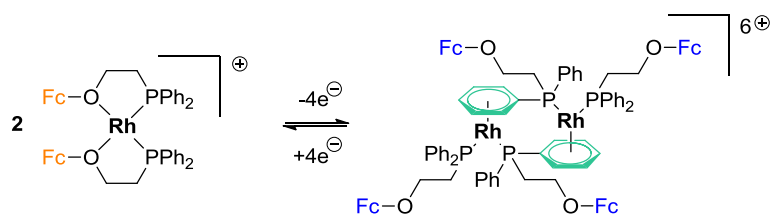


Schéma 52 : Complexe métallique cationique depuis des RHL neutres.¹⁴¹

Les RHL sont généralement utilisés pour améliorer les propriétés électroniques du centre métallique. Ils permettent, par là même, le contrôle de sa sphère de coordination *i.e.* les propriétés stériques et électroniques ainsi que la réactivité de ses liaisons formées. Plus généralement, l'affinité de liaison du groupement labile pour le métal de transition peut être contrôlée par l'ajustement de l'état d'oxydation du groupement redox.

F. La chiralité planaire des ferrocènes¹⁴²

La chiralité planaire est engendrée par la présence de plans chiraux dans les molécules. Ils doivent contenir le maximum d'atomes possibles de la molécule, mais comporter au moins un coordina hors de ce plan. Les composés présentant une chiralité planaire sont essentiellement des paracyclophanes, des annulènes pontés ou encore des métallocènes (Figure 37).

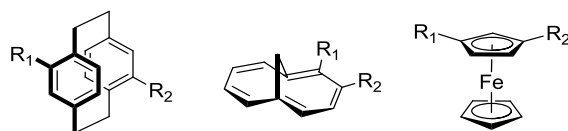


Figure 37 : Exemples de composés présentant une chiralité planaire.

Lorsqu'il est substitué, par exemple, en positions 1,2 - 1,3 et 1,1' par deux substituants différents, le ferrocène présente une chiralité planaire (Figure 38).

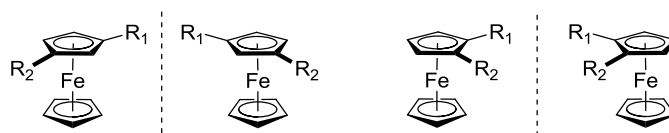


Figure 38 : Chiralité planaire de ferrocènes substitués en position 1,3 et 1,2.

Bien que les enzymes soient davantage employées pour obtenir des composés optiquement actifs, il a été récemment décrit, l'utilisation d'un dérivé chiral de DMAP comportant un ferrocène polysubstitué pour la résolution d'alcools secondaires racémiques (Figure 39).¹⁴³

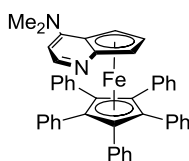


Figure 39 : Un dérivé ferrocénique chiral de DMAP employé pour la résolution d'alcools secondaires racémiques.¹⁴³

¹⁴² E. L. Eliel, S. H. Wilen, L. N. Mander, In *Stereochemistry in Organic Compounds*; Wiley: New-York, **1994**

¹⁴³ A. E. Diaz-Alvarez, L. Mesas-Sanchez, and P. Dinér *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 502- 504

G. Exemples de molécules bioactives comportant un groupement ferrocène et leur mode d'action

Leur grande stabilité en phase aqueuse et à l'air ainsi que leurs propriétés d'oxydoréductions étonnantes font de la plupart des dérivés du ferrocène des candidats appréciés et, de ce fait, également employés en chimie médicinale. Bien que leur mode d'action ne soit pas toujours bien connu, plusieurs études ont montré que des dérivés ferrocényles étaient actifs *in vitro* et *in vivo* vis-à-vis de plusieurs maladies *e.g.* infections fongique, bactérienne, virale, parasitaire ou encore le désordre métabolique tel que le cancer.¹⁴⁴

D'un point de vue historique, le premier dérivé proposé et étudié comme anticancéreux potentiel (envers la leucémie lymphoïde P-388) a été décrit par Brynes *et al.* à la fin des années 70 (Figure 40).

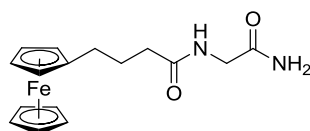


Figure 40 : Dérivé ferrocényle comportant des groupements amides, évalué sur la leucémie P-388 : structure pouvant se lier aux acides nucléiques à la surface des cellules tumorales.¹⁴⁵

Dans ce cas précis, ce composé, administré par voie intrapéritonéale, n'augmente que faiblement le taux de survie des souris (T/C de 132 %).¹⁴⁵ Il n'a pas la prétention d'être un anticancéreux révolutionnaire mais a permis d'exalter pour la première fois la formation d'agents antitumoraux par incorporation d'un ferrocène dans un châssis moléculaire approprié.

Cette innovation a généré toute une série de composés présentant un ou plusieurs ferrocènes.

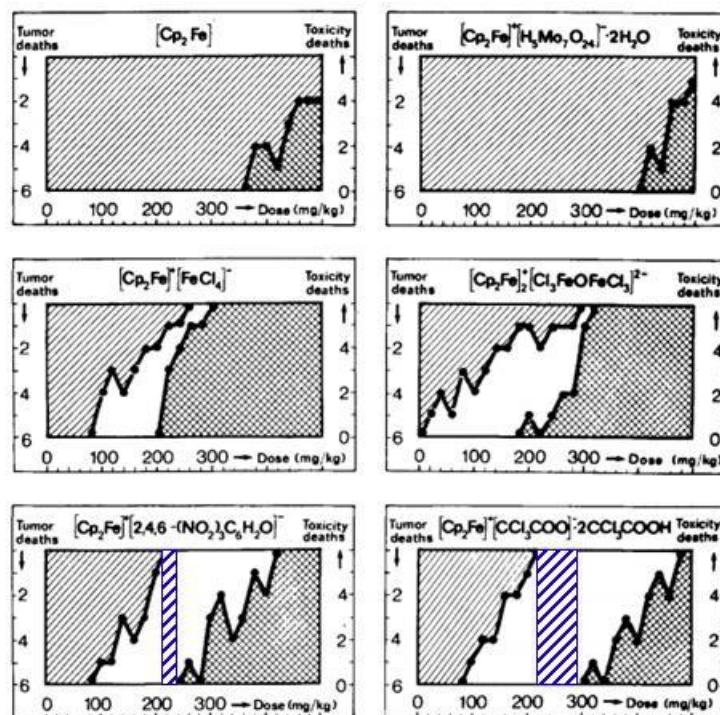
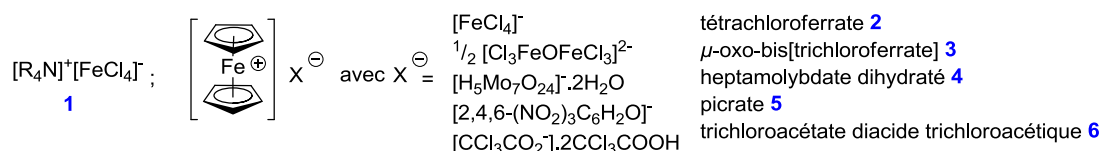
1. Les sels de ferricinium¹⁴⁶

Six ans plus tard, Köpf-Maier *et al.* étudièrent l'activité antinéoplasique des complexes ferriques et ferriciniums sur la lignée cellulaire EAT (tumeur ascitique d'Ehrlich) (Figure 41).

¹⁴⁴ C. Ornelas *New J. Chem.* **2011**, 35, 1973-1985

¹⁴⁵ V. J. Fiorina, R. J. Dubois, S. Brynes *J. Med. Chem.* **1978**, 4, 393-395

¹⁴⁶ P. Köpf-Maier, H. Köpf, E. W. Neuse *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* **1984**, 108, 336-340 P. Köpf-Maier, H. Köpf, E. W. Neuse *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* **1984**, 108, 336-340



- « mort toxique » - décès lié à la toxicité du traitement observé durant les 8 premiers jours p.t.t.
 □ « guérie » - souris ayant survécu après 90 jours p.t.t.
 ▨ « mort tumorale » - décès lié au développement de la tumeur entre 8 et 90 jours p.t.t.
 ▤ doses optimales pour une totale guérison des souris

les souris du groupe contrôle décèdent autour du 15^{ème} jour p.t.t.

Figure 41 : Influence de la dose du ferrocène $[Cp_2Fe]$ et des complexes ferriciniums $[Cp_2Fe]^+X^-$ sur le taux de survie des souris - p.p.t : *post transplantationem tumoris*.¹⁴⁶

Ces graphes nous renseignent quant à l'influence de la dose des complexes ferrocéniques administrée sur la survie des souris. Il ressort de ces analyses que seuls les groupes de souris traités par les complexes **5** et **6**, respectivement aux doses 220-240 mg/kg et 220-300 mg/kg, sont considérés comme guéris. Dans cette étude, deux conditions *sine qua non* permettent cette efficacité de traitement :

- Le dérivé administré doit être soluble, ce qui n'est pas le cas pour le ferrocène ainsi que pour le dérivé **4**.
- Il doit comporter un motif ferricinium

S'en sont suivis de nombreux travaux de recherche sur les sels de ferriciniums.^{147,148,149} D'une manière générale, il faut retenir que l'activité anti-cancéreuse semble varier selon la nature du contre-ion et du type de cancer.

2. L'hydroxyferrocifène, un bioisostère du tamoxifène¹⁵⁰

Le tamoxifène est un médicament utilisé chez des patientes atteintes du cancer du sein hormono-dépendant. La forme active du tamoxifène est en réalité son métabolite, l'hydroxytamoxifène (OH-Tam). Mais, pour des raisons de biodisponibilité, c'est le tamoxifène qui est administré. L'action antiproliférative de l'hydroxytamoxifène est due à une liaison compétitive aux récepteurs oestrogènes. La transcription de l'ADN oestradiomédiée est alors réprimée dans les tissus tumoraux. Néanmoins des phénomènes de résistance peuvent être rapidement atteints par les cellules tumorales, et avoir, pour conséquence, une inefficacité de traitement.¹²⁹

Afin d'accéder à des dérivés du tamoxifène plus performants, le Professeur Jaouen et son équipe ont synthétisé l'hydroxyferrocifène (Figure 42) qui possède, à la place du groupement phényle, un groupement ferrocényle isostère.

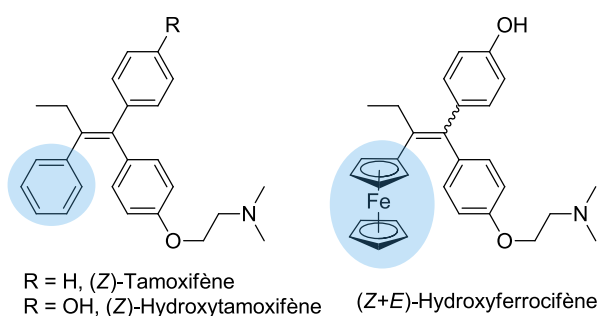


Figure 42 : L'hydroxyferrocifène, bioisostère de l'hydroxytamoxifène.¹⁵⁰

Le ferrocène peut être, en effet, considéré comme un bon isostère du benzène en rotation (Figure 43).

¹⁴⁷ P. Köpf-Maier, H. Köpf *Bioinorg. Chem.* **1988**, 70, 103-185

¹⁴⁸ E. W. Neuse, F. Kanzawa *Appl. Organomet. Chem.* **1990**, 4, 19-26

¹⁴⁹ L. V. Popova, V. N. Babin, Y. A. Belousov, Y. S. Nekrasov, A. E. Snegireva, N. P. Borodina, G. M. Shaposhnikova, O. B. Bychenko, P. M. Raevskii, N. B. Morozova, A. I. Iiyina and K. G. Shitkov, *Appl. Organomet. Chem.* **1993**, 7, 85-94

¹⁵⁰ S. Top, A. Vessièrès, G. Leclercq, J. Quivy, J. Tang, J. Vaissermann, M. Hucher, G. Jaouen *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 5223- 5236

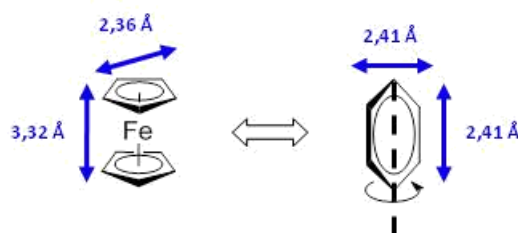


Figure 43 : Le ferrocène, isostère du benzène en rotation.^{151,152,153}

Dans ce cas précis, ce motif est susceptible de former des dérivés de type quinone-méthylène. La présence d'un groupement ferrocényle rattaché à un système π délocalisé porteur de deux groupements de type phényles du même côté de la double liaison sont, en effet, des conditions structurales essentielles requises pour exalter une réponse cytotoxique (Schéma 53).

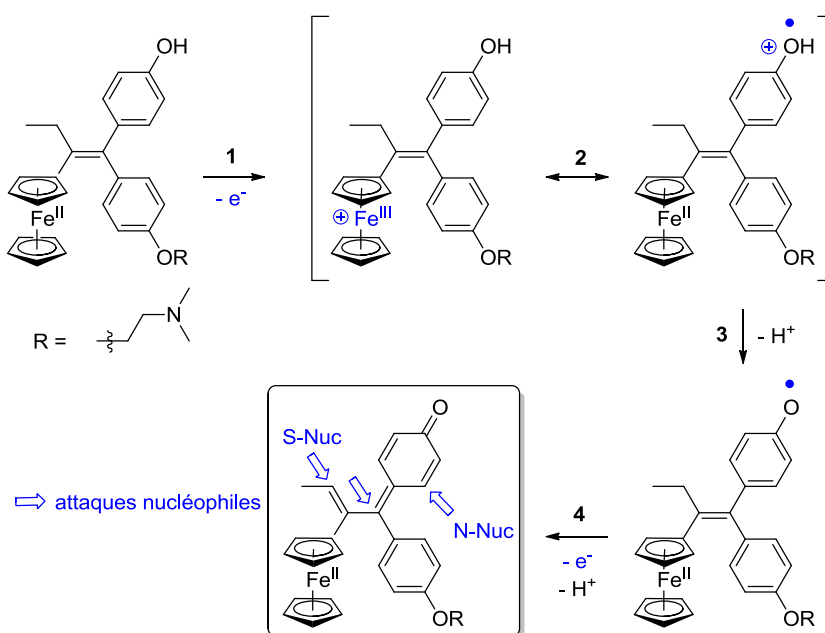


Schéma 53 : Formation de quinone-méthylène cytotoxique à partir de l'hydroxyferrocène.¹⁵⁴

Les conditions physiologiques permettent, au départ, le processus d'activation redox et les réactions acido-basiques.¹⁵⁴ Lors de l'oxydation du ferrocène (1), la charge positive est partiellement délocalisée sur le groupement hydroxyle en position *para* via le système π conjugué (2) : le proton est acide et devient alors accessible à une base (3) présente dans le

¹⁵¹ E. W. Neuse *J. Inorg. Organomet. Polym.* **2005**, 15, 3-32

¹⁵² J. Dunitz, L. Orgel, A. Rich *Acta Crystallogr.* **1956**, 9, 373-375

¹⁵³ P. F. Eiland, R. Pepinsky *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 4971

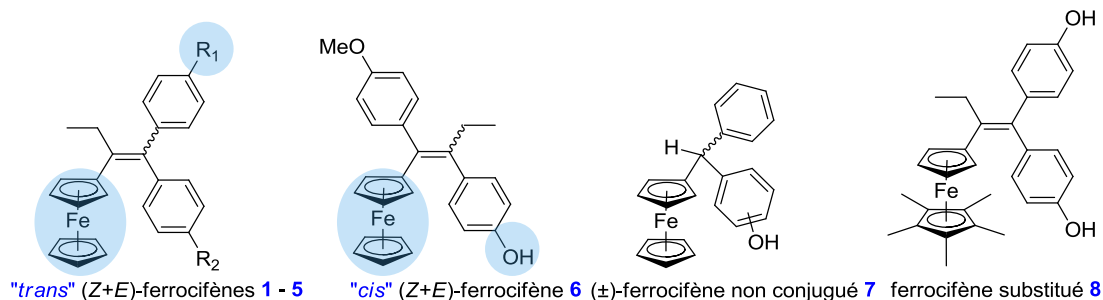
¹⁵⁴ U. Schatzschneider, N. Metzler-Nolte *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 1504-1507

milieu. Cette délocalisation du radical a été démontrée par calculs DFT. Dans une seconde étape d'oxydation, la perte du proton forme une quinone méthylène. Elle est reconnue pour être exceptionnellement stable avec une durée de demi-vie de 3 heures sous conditions physiologiques. S'en suivent des réactions d'addition de Michael de type 1-6 et 1-8 avec des glutathions (S-Nuc). En revanche, la position 5 est plus réactive vis-à-vis des bases nucléiques (N-Nuc) (**4**). Les adduits formés, à partir d'ADN des cellules cancéreuses, seraient à l'origine du potentiel mutagène et de la toxicité en général.¹²⁹

En plus de l'hydroxyferrocène, les analogues **1-8** ont été préparés afin de confirmer les éléments structuraux favorables à une réponse cytotoxique envers la lignée cancéreuse du sein MDA-MB231.^{155,156}

¹⁵⁵ E. Hillard, A. Vessières, L. Thouin, G. Jaouen, C. Amatore *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 291-296

¹⁵⁶ C. G. Hartinger, P. J. Dyson *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 391-401



Composés ^a	R ₁	R ₂	Effet antiprolifératif sur MDA-MB231 % d'inhibition ^b	Effet cytotoxique ^c	Transfert d'électron ^d
OH-Tam			/	-	na
1 ^e	H	H	/	-	non
2	OH	H	35	+	oui
3	OH	OH	71	+	oui
4	OH	OMe	16	-/+	oui
5a	OH	O(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	53	+	oui
5b	OH	O(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	77	+	oui
5c	OH	O(CH ₂) ₅ N(CH ₃) ₂	80	+	oui
6			3	-	non
o-OH - 7a			26	-/+	non
m-OH - 7b			18	-/+	non
p-OH - 7c			16	-/+	non
8			/	-	non

^a IC₅₀ ca. 0,5 µM sur lignées cellulaires MDA-MB231, sauf pour OH-Tam - non actif à l'échelle submicromolaire (34 µM) et IC₅₀ (ferrocène) ~ 160 µM

^b déterminé à partir d'une concentration de 1 µM en composé, après 6 jours d'incubation - le contrôle étant défini à 100 %

^c effet cytotoxique considéré comme positif (+) pour un effet antiprolifératif supérieur à 30 %, (-/+) pour un effet compris entre 10 et 30 % et (-) pour un effet inférieur à 10 %

^d observé par l'apparition ou non de la vague retour de réduction du ferricinium en présence de pyridine par voltammétrie cyclique

^e pas d'isomérisation Z et E ni d'appellation « cis » ou « trans »

Tableau 15 : Résultats biologiques et électrochimiques de dérivés ferrocényles.¹⁵⁵

Il ressort de cette étude les points importants suivants :

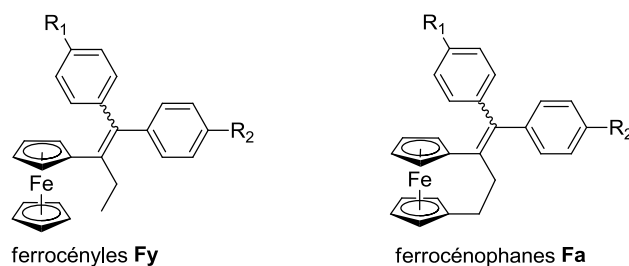
- Les dérivés ferrocényles présentent dans l'ensemble un remarquable comportement antiprolifératif, phénomène non observé pour le dérivé benzénique, l'hydroxytamoxifène, OH-Tam. Ceci démontre clairement que l'effet cytotoxique est essentiellement attribué à la présence du ferrocène
- La nature des groupements R_1 et R_2 influe sur le % d'inhibition : la présence d'un voire deux groupements hydroxyles modifie favorablement la réponse antiproliférative.
- La position de ces groupements est elle aussi essentielle. Le « *cis* » ferrocifène **6** inhibe cinq fois moins que son analogue « *trans* » **4** et jusqu'à 26 fois moins pour les « *trans* » ferrocifènes **2-5**.
- Le système conjugué de type 1,1-diaryléthène favorise la réponse antiproliférative mais n'est pas l'élément indispensable car le ferrocifène **7** présente une activité cytotoxique non négligeable.
- Contrairement au ferrocifène **3**, son analogue pentaméthylé **8** n'a aucun effet cytotoxique. Le cycle pentaméthylé engendre une modification importante du diagramme moléculaire faisant varier la différence d'énergie entre la HOMO et la LUMO et jouant donc sur les propriétés d'oxydoréduction qui en découlent. Le composé **8** n'a donc pas les caractéristiques exigées pour être un anticancéreux.

Par ailleurs le transfert d'électrons a été analysé par voltamétrie cyclique et il n'est observé que dans les cas où les conditions *sine qua non* sont réunies c'est-à-dire dans le cas de produits phénoliques conjugués :

- Le composé non-phénolique **1** n'induit aucun transfert d'électron. Celui-ci n'est assuré que lorsque les composés comportent, en plus des autres conditions requises, un groupement phénol.
- Le système 1,1-diaryléthène semble être essentiel au transfert d'électron. Les ferrocifènes non-conjugués **7a-c** ne possédant pas ce motif, aucun transfert électronique n'est observé.

Une autre étude SAR a été menée afin d'affiner les conditions structurelles adaptées pour une réponse efficace. Une série ferrocényle Fy est comparée à une autre série composée de dérivés ferrocénophanes Fa (Tableau 16).¹⁵⁷

¹⁵⁷ M. Görmen, P. Pigeon, S. Top, E. A. Hillard, M. Huché, C. G. Hartinger, F. De Montigny, M.-A. Plamont, A. Vessières, G. Jaouen *Chem. Med. Chem.* **2010**, 5, 2039-2050



Composés	R ₁	R ₂	Fy IC ₅₀ [μm]	Fa IC ₅₀ [μm]	Ratio Cytotoxique ^a
1	H	H	7,54	0,92	8,2
2	OH	H	1,54	0,47	3,3
3	OH	OH	0,64	0,09	7,1
9	NH ₂	H	0,86	0,21	4,1
10	NH ₂	OH	0,55	0,06	0,9
11	NH ₂	NH ₂	-	0,05	-

^a IC₅₀(Fy)/IC₅₀(Fa)

Tableau 16 : IC₅₀ des dérivés ferrocénophanes Fa et ferrocényles Fy sur lignée cellulaire MDA-MB231.¹⁵⁷

La conclusion la plus évidente est que les composés en série ferrocénophane observent tous des IC₅₀ submicromolaires jusqu'à 8 fois inférieures aux analogues en série ouverte. La présence de plusieurs groupements hydroxyles diminue de plus d'un facteur 5 la valeur d'IC₅₀. Le remplacement d'un ou plusieurs phénols par une aniline améliore aussi considérablement la cytotoxicité vis-à-vis de la lignée cellulaire MDA-MB231.

Encore une fois, l'analyse du diagramme moléculaire apporte une explication cohérente à ce phénomène. Avec une différence d'énergie HOMO-LUMO plus faible, les complexes ferrocénophanes oxydés atteignent plus facilement leur premier état excité et sont de ce fait plus réactifs. Des considérations structurales, dues à la rigidité du squelette ferrocénophane, sont également à prendre en compte pour expliquer leur gain d'efficacité en cytotoxicité.

D'une manière plus générale, ces résultats ne doivent pas pour autant exclure des structures ne proposant pas la formation de quinone-méthylène *in situ*. Bien que les dérivés d'hydroxyferrocifène continuent d'être évalués et suscitent l'intérêt de nombreux scientifiques, d'autres travaux de recherche sur les dérivés du ferrocène non « quinone-méthylés » méritent d'être présentés.

3. Etude d'un autre anticancéreux contenant un motif ferrocène

Il existe plusieurs exemples dans la littérature décrivant l'activité cytotoxique de composés comportant un groupement ferrocényle. Bien qu'ils n'entrent pas dans la classe de composés de type quinone-méthylène, ils n'en demeurent pas moins efficaces. L'exemple suivant présente un certain intérêt car les études biologiques consacrées aux dérivés **1a-f** sont de même nature que celles envisagées au sein de notre laboratoire.¹⁵⁸ Une étude préliminaire est menée en évaluant l'effet des ces composés sur la viabilité cellulaire de la lignée A549 (adénocarcinome humain de cellules épithéliales basales alvéolaires) et est regroupée dans les graphes suivants (Figure 44).

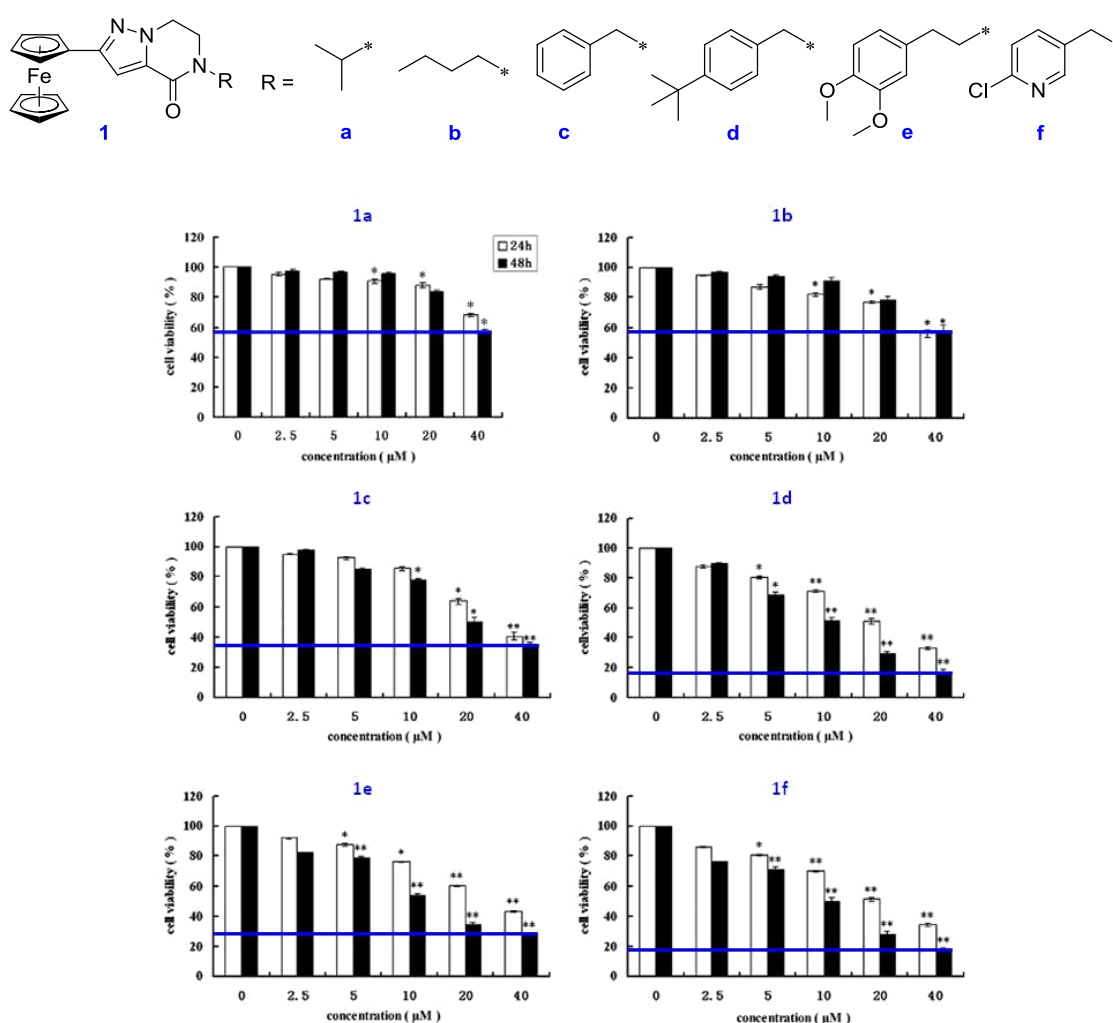


Figure 44 : Effet des composés **1a-f** sur la viabilité cellulaire du modèle A549 (lignée cancéreuse du poumon) à 24 et 48 h sur des concentrations comprises entre 2,5 et 40 μM (n=3).¹⁵⁸

¹⁵⁸ Y.-S. Xie, X.-H. Pan, B.-X. Zhao, J.-T. Liu, D.-S. Shin, J.-H. Zhang, L.-W. Zheng, J. Zhao, J.-Y. Miao *J. Organomet. Chem.* **2008**, 693, 1367-1374

Composé	1a	1b	1c	1d	1e	1f	5-FU ^a
Viabilité cellulaire (%) ^b	60	60	35	16	28	19	-
Inhibition de la croissance cellulaire (μM) ^c	45	44	23	10	12	10	13

^a 5-FU : 5-fluorouracile, contrôle positif

^b pourcentage évalué à 48 h et à 40 μM du composé (**1 a-f**)

^c IC₅₀ mesurée à 48 h

Tableau 17 : Evaluation de la toxicité cellulaire et des propriétés inhibitrices sur la croissance cellulaire de la lignée A549 des composés 1a-f.¹⁵⁸

L'information principale à tirer de ces résultats (Tableau 17) est que seuls les composés **1d-f** démontrent une action cytotoxique.

- Leur effet sur la viabilité cellulaire avoisine les 40 % après 24 h d'incubation et n'excède pas 30 % après 48 h (Figure 44).
- Et leur inhibition sur la croissance cellulaire est équivalente à celle du contrôle positif 5 - fluorouracile (Tableau 17).

Par la suite l'équipe poursuit l'étude sur les composés **1d-f** en mettant en place plusieurs analyses biologiques permettant de révéler l'action cytotoxique des dérivés ferrocéniques. Celles-ci impliquent d'une part, une analyse morphologique des cellules après traitement et d'autre part une analyse de la fragmentation d'ADN nucléaire (Figure 45).¹⁵⁹

¹⁵⁹ X.-H. Pan, X. Liu, B.-X. Zhao, Y.-S. Xie, D.-S. Shin, S.-L. Zhang, J. Zhao, J.-Y. Miao *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9093-9100

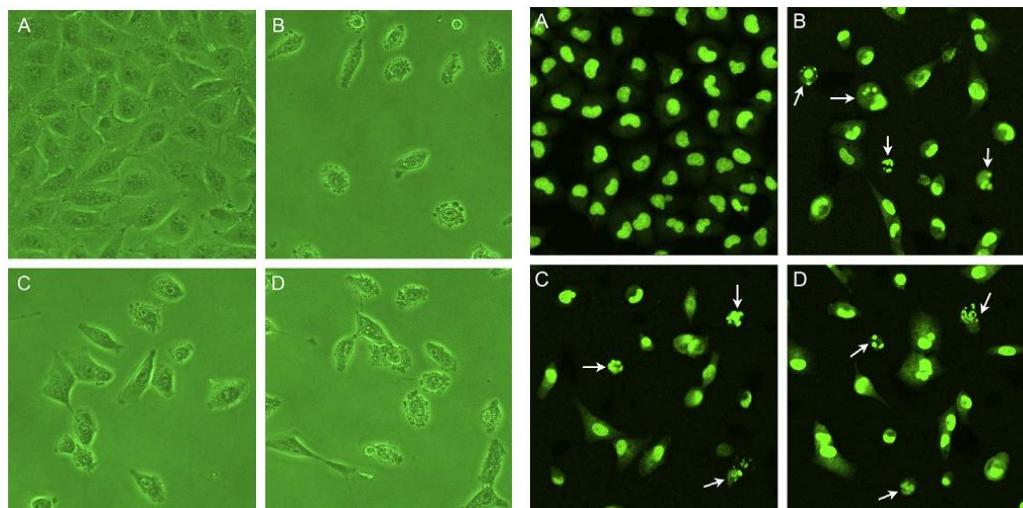
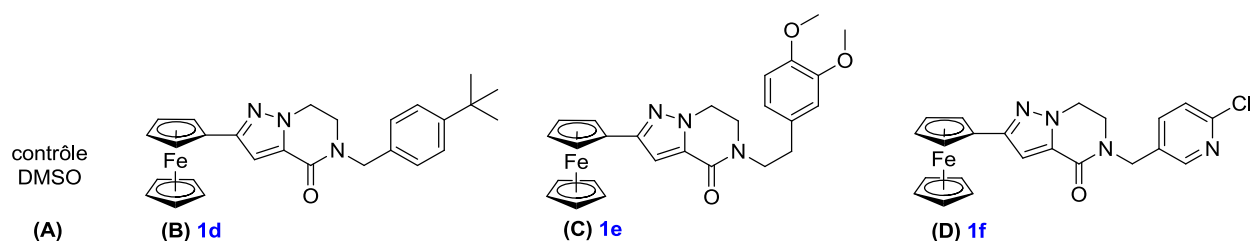


Figure 45 : A gauche - analyse morphologique des cellules A549 traitées avec **1d-f** (20 μ M) à 48 h. Les images ont été obtenues à l'aide d'un microscope à contraste de phase (400x). A droite - analyse de la fragmentation d'ADN nucléaire des cellules A549 traitées avec **1d-f** (20 μ M) à 48 h - les images ont été obtenues à l'aide d'un microscope confocal.¹⁵⁹

Un changement de morphologie traduisant la perte d'adhérence des cellules traitées associé à une diminution notable de celles-ci résultant du phénomène d'apoptose sont observés de manière significative (Figure 45 - gauche).

L'autre examen montre clairement que les cellules traitées sont polynuclées (indiquées par les flèches) (Figure 45 - droite) - elles présentent une condensation de la chromatine et une fragmentation de l'ADN.

Tout un panel d'analyses est investi pour comprendre comment les composés **1d-f** peuvent induire l'apoptose en modulant la concentration en intégrine $\beta 4$ - protéine impliquée dans le processus d'angiogenèse tumorale et dans sa prolifération. La formation d'espèces oxygénées réactives (ROS : *reactive oxygen species* - Figure 46) est elle aussi évaluée afin de connaître la relation qui existe avec le phénomène apoptotique.

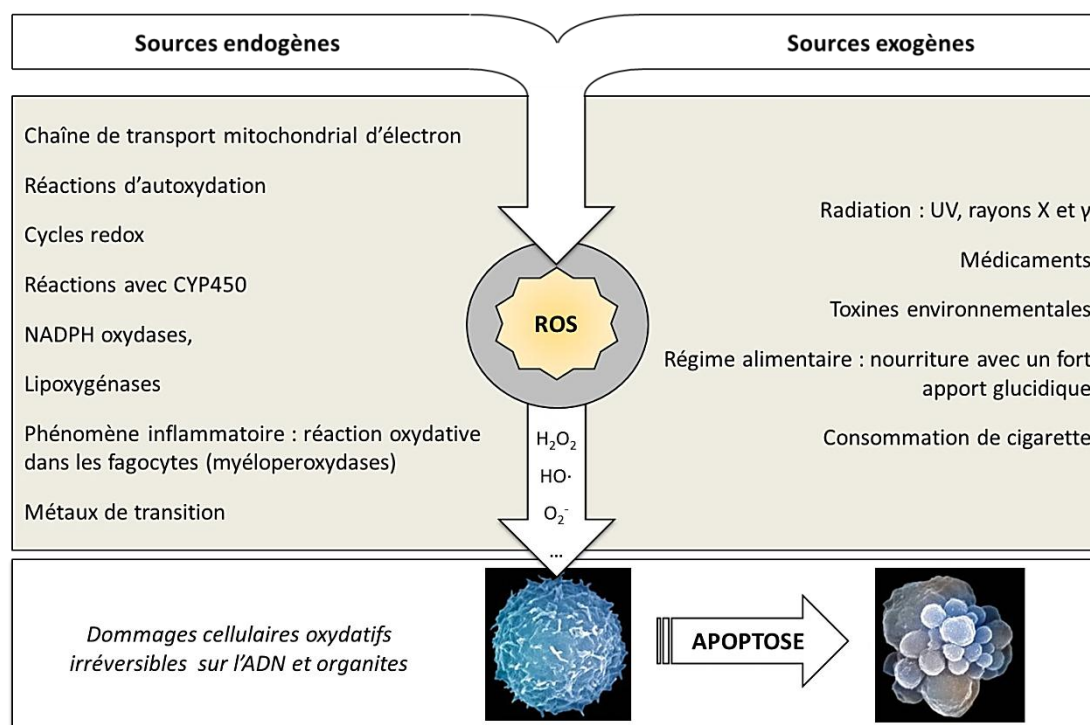


Figure 46 : Sources endogènes et exogènes générant les ROS.

Il n'y a pas d'intérêt majeur à énoncer l'ensemble des analyses effectuées. Toutefois donner la synthèse des résultats (Figure 47) peut aider à la compréhension d'un mécanisme d'action cytotoxique des dérivés ferrocényles.

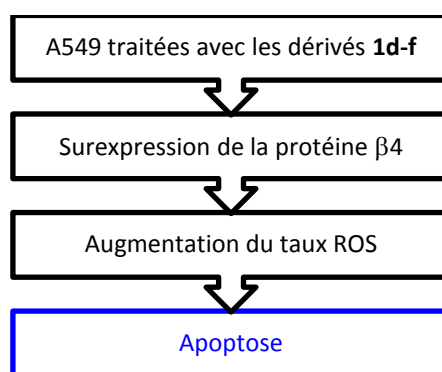


Figure 47 : Relation de cause à effet des dérivés ferrocényles 1d-f sur les taux d'intégrine β4 et de formation de ROS sur l'apoptose des cellules A459.

La protéine β4 est surexprimée (2 à 3 fois plus) dans les cellules traitées durant 48 h avec les dérivés **1d-f** (20 μM) par rapport au groupe contrôle. Le taux ROS a été mesuré par microscopie confocale à fluorescence. L'intensité relative de fluorescence est deux fois plus importante pour les lots traités par les composés **1d-f**. Le pourcentage de cellules apoptotiques est dix fois plus important que dans le groupe contrôle et est quantifié par la méthode TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling*) : technique détectant la fragmentation d'ADN et mesurant le taux d'apoptose.

Bien que les analyses convergent vers le même résultat : l'apoptose des cellules A549, il n'en demeure pas moins la question de savoir si oui ou non cette action cytotoxique est essentiellement due à la présence du motif ferrocényle dans les composés **1d-f**.

Elucider les mécanismes d'action cytotoxique de ce type de composé semble être une énigme de taille en oncologie. Le cas des quinones-méthylènes mis à part, aucune autre hypothèse mécanistique, à l'échelle moléculaire, n'a pu être confirmée.

4. La ferroquine - un antipaludéen prometteur

Il existe, cependant, un deuxième mécanisme étudiant les effets cytotoxiques des molécules comportant un groupement ferrocényle dans le cas du traitement contre le paludisme (Annexe 5). Bien que cette maladie mette en jeu des acteurs très différents de ceux impliqués en cancérologie, le mécanisme n'en demeure pas moins intéressant, car il est en phase d'être complètement élucidé.

La quête de nouveaux traitements antipaludéens est en perpétuel avancement car elle va de paire avec les formes de résistances issues des différentes espèces du genre *Plasmodium sp.*, parasite à l'origine du paludisme. La chloroquine (Figure 48), molécule présentant de faibles coûts de production et toujours efficace contre les espèces autres que *falciparum*, est conservée en vue d'y apporter les futures améliorations. Une nouvelle fois la chimie organométallique prouve qu'elle peut offrir les solutions de demain. En effet, la ferroquine (Figure 48) s'est très vite imposée comme le meilleur candidat pour un développement industriel et était entrée, en 2009, en phase clinique II.^{160,161}

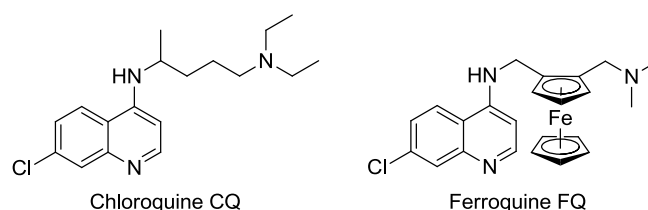


Figure 48 : Structure de la chloroquine CQ et ferroquine FQ.

¹⁶⁰ Références pour les essais cliniques de phase II <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00988507> - arrêt du projet en 2011

¹⁶¹ C. Biot, G. Glorian, L. A. Maciejewski, J. S. Brocard *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3715-3718

Quant au mécanisme d'action, il est possible d'établir un parallèle entre la chloroquine et la ferroquine : ces molécules exercent toutes deux leur action en interférant avec le processus de détoxification de l'hème par le parasite lors de la digestion de l'hémoglobine de l'hôte (Annexe 5).¹⁶² Ensuite, et de façon tout à fait originale, la ferroquine pourrait également agir, via la chimie du ferrocène, en générant des radicaux libres (Figure 49).¹⁶³

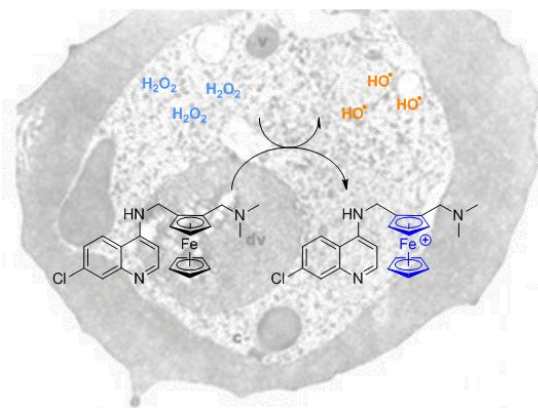


Figure 49 : Production de radicaux hydroxyles par la ferroquine dans la vacuole digestive du parasite.^{164,165}

La vacuole digestive du parasite rassemble les conditions optimales - milieu acide et oxydant - pour provoquer la formation de radicaux hydroxyles à partir de l'eau oxygénée qui y est présente, par une réaction de Fenton catalysée par le fer du ferrocène. Cette production serait létale pour le parasite. En effet, ces radicaux sont connus pour provoquer de graves dommages sur toutes les molécules biologiques, en particulier par peroxydation extensive des acides gras polyinsaturés présents dans les membranes. Par ailleurs, en inhibant la formation de l'hémozoïne, la ferroquine maintiendrait une concentration létale d'hème, dont la nature amphiphile aurait pour conséquence de renforcer son action déstabilisante sur la membrane vacuolaire conduisant à la lyse membranaire.¹⁶⁶ Les développements futurs de la ferroquine constituent un espoir considérable pour les populations infectées. L'état actuel des connaissances laisse supposer que la ferroquine serait à l'abri d'une interaction avec les systèmes de transports impliqués dans la résistance, *e.g.* PfCRT. Si ce concept est vérifié, son mode d'action pourrait s'étendre à certaines formes de cancer, en adaptant le ciblage du médicament au compartiment cellulaire impliqué.¹⁶⁵

¹⁶² C. Biot, D. Taramelli, I. Forfar-Bares, L. A. Maciejewski, M. Boyce, G. Nowogrocki, J. S. Brocard, N. Basilico, P. Olliaro, T. J. Egan *Mol. Pharmaceutics* **2005**, 2, 185-193

¹⁶³ N. Chavain, H. Vezin, D. Dive, N. Touati, J.-F. Paul, E. Buisine, C. Biot *Mol. Pharmaceutics* **2008**, 5, 710-716

¹⁶⁴ S. E. Francis, D. J. Sullivan Jr., D. E. Goldberg *Annu. Rev. Microbiol.* **1997**, 51, 97-123

¹⁶⁵ C. Biot, D. Dive *L'actualité chimique - juin-juillet-août* **2011**, n° 353-354, 93-96

¹⁶⁶ F. Dubar, T. J. Egan, B. Pradines, D. Kuter, K. K. Ncokazi, D. Forge *ACS Chem. Biol.* **2011**, 6, 275-287

II. Synthèse et évaluation biologique de dérivés de l'amino-benzosubérone comportant un ou deux groupements ferrocènes

A. Vers la synthèse des dérivés ferrocényles

Une nouvelle génération de composés a été synthétisée au laboratoire en se fondant sur une stratégie consistant à allier les propriétés cytotoxiques potentielles du ferrocène au fort pouvoir inhibiteur de nos molécules dérivées de la 7-amino-6-benzosubérone (Figure 50).

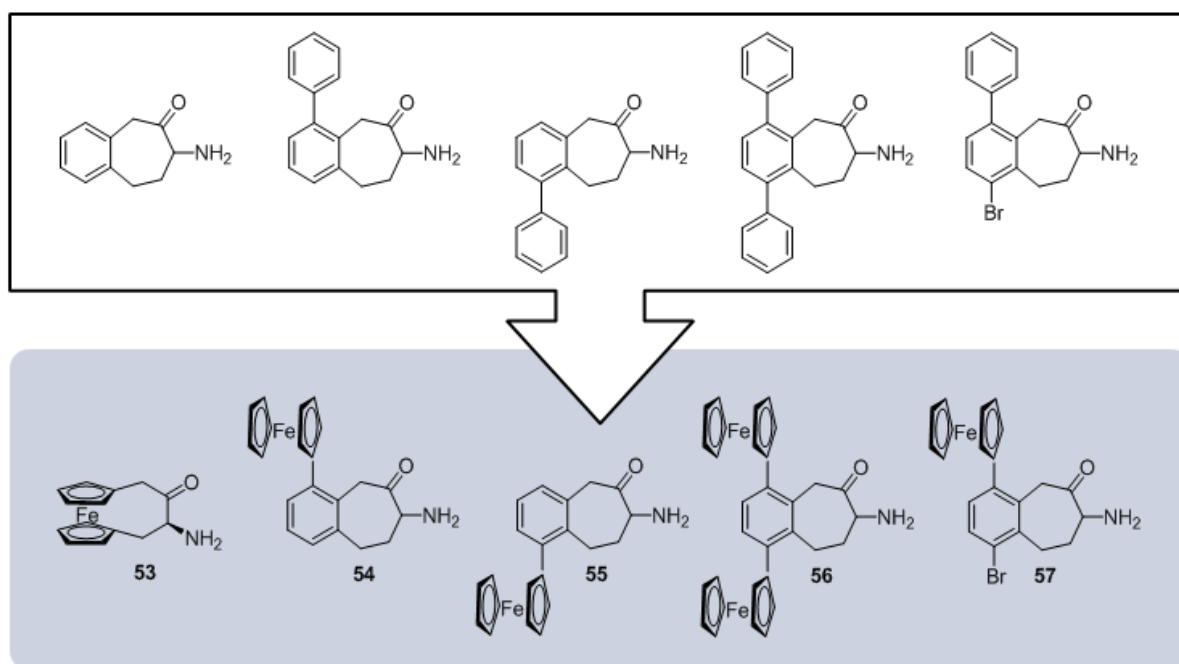


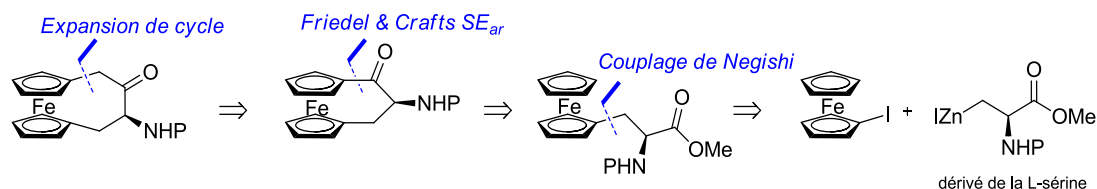
Figure 50 : Nouvelle génération de composés ferrocényles (**53-57**) isostères des dérivés phénylés.

Les expériences que nous avons réalisées visant à accéder aux dérivés **53-57** sont présentées ci-après.

1. Synthèse du dérivé **53**

a. En série optiquement active

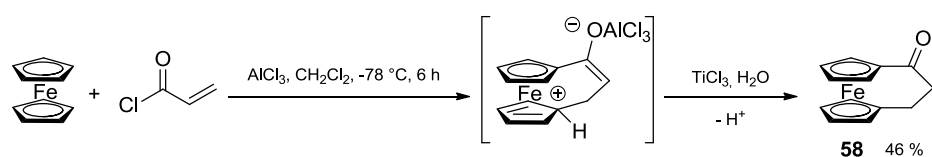
Le remplacement du noyau aromatique de l'amino-benzosubérone non substituée, par un ferrocényle impose une approche synthétique différente de ce qui a été vu jusqu'à présent. Nous nous proposons d'accéder au dérivé ferrocényle **53** selon la rétrosynthèse décrite Schéma 54 faisant intervenir comme produit de départ un dérivé de la L-sérine et, comme réaction clé, un couplage de type Negishi.

Schéma 54 : Analyse rétrosynthétique d'accès au dérivé **53** à partir du iodoferrocène.

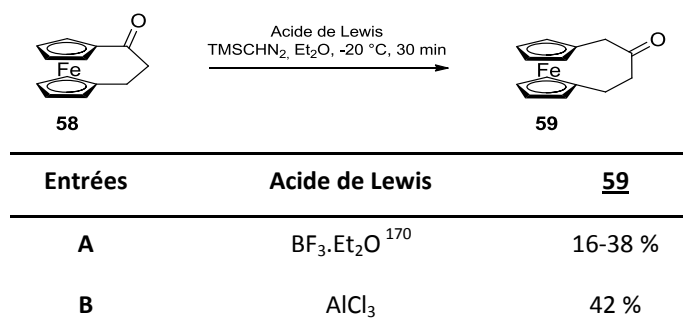
L'agrandissement de cycle peut s'obtenir grâce à une homologation de type Arndt-Eistert faisant intervenir du TMSCHN_2 et un acide de Lewis. L'obtention du motif ferrocénophanone est envisageable grâce à une annélation de type Friedel & Crafts précédée d'un couplage de Negishi, entre le iodoferrocène et un dérivé de la L-sérine, porteur du centre asymétrique.

Avant de nous intéresser à la synthèse du dérivé **53**, nous avons tout d'abord souhaité mettre en place l'agrandissement de cycle sur un dérivé simple : la ferrocénophanone.

Celle-ci a été obtenue avec un rendement moyen, par acylation de type Friedel-Crafts, à partir du ferrocène et du chlorure d'acryloyle (Schéma 55).^{167,168}

Schéma 55 : Accès à la ferrocénophanone **58** à partir du ferrocène et du chlorure d'acryloyle.

L'agrandissement de cycle, qui suit, a été décrit pour la première fois par Rosenblum *et al.*¹⁶⁹

Tableau 18 : Acides de Lewis employés pour l'homologation de la ferrocénophanone **58**.

¹⁶⁷ Ö. Dogan, V. Şenol, S. Zeytinci, H. Koyuncu, A. Bulut *J. Organomet. Chem.* **2005**, 690, 430-434

¹⁶⁸ T. D. Turbitt, W. E. Watts *J. Organomet. Chem.* **1972**, 46, 109-117

¹⁶⁹ M. Rosenblum, A. K. Banerjee, N. Danieli, R. W. Fish, V. Schlatter *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 316-324

¹⁷⁰ T. L. Smalley Jr. *Synthetic Comm.* **2004**, 34, 1973-1980

Les conditions initiales que nous avons retenues au départ employaient le complexe $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ comme acide de Lewis. Suite à des problèmes de reproductibilité, celui-ci a été rapidement remplacé par AlCl_3 . La reproductibilité s'est avérée alors meilleure avec des rendements proches de 50 %. Il est à noter que deux autres produits **60** et **61** ont également été obtenus (Schéma 56).

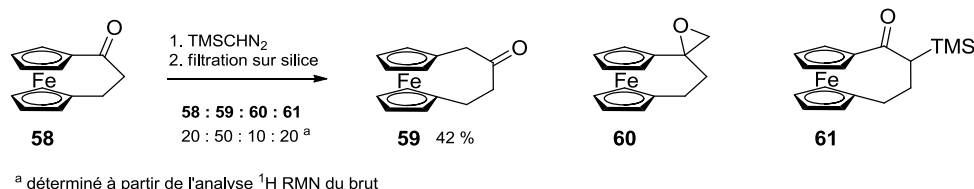


Schéma 56 : Produit **59** et sous-produits **60** et **61** obtenus lors de l'homologation de la ferrocénophanone **58**.

Bien que le rendement sur ces deux étapes ne dépasse pas les 20 %, cette séquence réactionnelle a tout de même été validée en vue de l'obtention du dérivé **53**.

L'iodoferrocène de départ **62**, a pu être obtenu par traitement au NIS de l'acide boronique correspondant comme présenté Schéma 57.¹⁷¹

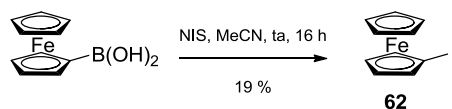


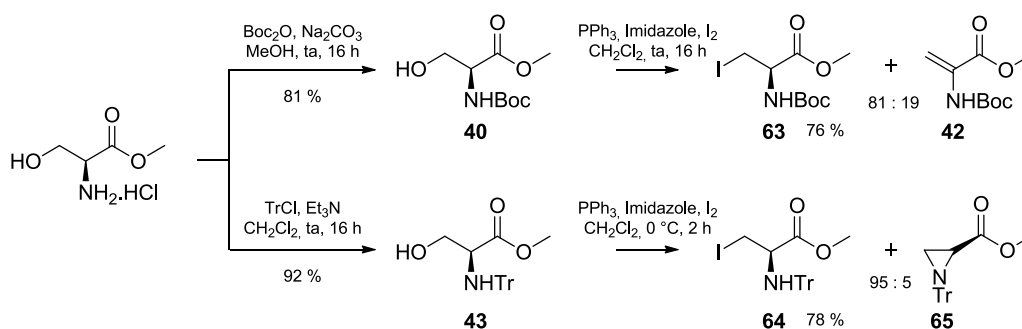
Schéma 57 : Accès à l'iodoferrocène **62** à partir de l'acide boronique correspondant.

Kamounah *et al.* ont obtenu le composé iodé **62** avec un rendement de 63 %. Bien que la synthèse ait été réalisée à l'abri de la lumière et en employant de l'acétonitrile distillé sur CaH_2 , le rendement obtenu au laboratoire ne dépasse pas les 20 % (trois essais ont été effectués). Il ne s'agit pas d'un problème de conversion car la totalité de l'acide boronique est consommée. Le problème réside avant tout dans la purification délicate du dérivé iodé à cause de sa volatilité ($E_{b760} = 48\text{-}49^\circ\text{C}$).¹⁷¹ De plus, d'après une analyse ^1H RMN de contrôle, celui-ci n'est pas très stable et se transforme au cours du temps en ferrocène (20 à 30 % formé au bout de 24 h).

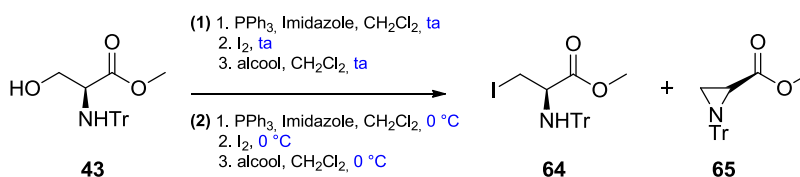
Deux dérivés iodés protégés issus de la L-sérine ont pu être préparés avec de bons rendements, comme présentés Schéma 58, en mettant à profit la méthode d'iodation de Garegg.¹⁷²

¹⁷¹ F. S. Kamounah, J. B. Christensen *J. Chem. Res. (S)* **1997**, 150

¹⁷² P. J. Garegg, B. J. Samuelsson *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1980**, 2866

Schéma 58 : Accès aux dérivés iodés **63** et **64** à partir du chlorhydrate de l'ester méthylique de la L-sérine.

Lors de la synthèse du dérivé NHBoc **63**, le produit secondaire **42** a été obtenu à près de 20 %. Bien que ces composés soient facilement séparables, nous avons cherché à minimiser la formation du produit de déhydroiodation en répétant la réaction sur un dérivé NHTr. Malheureusement, lors de la préparation de ce dérivé, un autre produit secondaire **65**, issu d'une cyclisation intramoléculaire, a été également obtenu. Toutefois la proportion en produit cyclisé **65** a pu être divisée par 6 en utilisant les conditions de Garegg à 0 °C (Tableau 19, entrée C).



Entrées	Conditions	Temps de réaction	43 ^a	64 ^a	65 ^a
A	(1) ¹⁷²	2 h	50 %	30 %	20 %
B	(2) ¹⁷³	16 h	0 %	67 %	33 %
C	(2) ¹⁷³	2 h	0 %	95 %	5 %

^a rendement déterminé par analyse ¹H RMN du brut réactionnel

Tableau 19 : Optimisation des conditions de Garegg pour accéder au dérivé iodé **64**.

La formation des aziridines issues de la cyclisation intramoléculaire de dérivés iodés de la L-sérine, est un problème récurrent dans la littérature.^{174,175,176,177} Celles-ci peuvent être également obtenues lors de réactions utilisant des conditions de Mitsunobu.¹⁷⁸

¹⁷³ B. M. Trost, M. T. Rudd *Org. Lett.* **2003**, 5, 4599-4602

¹⁷⁴ C. Dugave, A. Menez *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 6067-6070

¹⁷⁵ Y. Kato, K. Fukumoto *Chem. Comm.* **2000**, 245-246

Un couplage de type Negishi a alors été envisagé pour obtenir le dérivé **67b** désiré (Schéma 59). Dans un premier temps, nous avons effectué le couplage avec le dérivé iodé NHBoc **63** afin d'utiliser le même synthon que Ross *et al.*¹⁷⁹

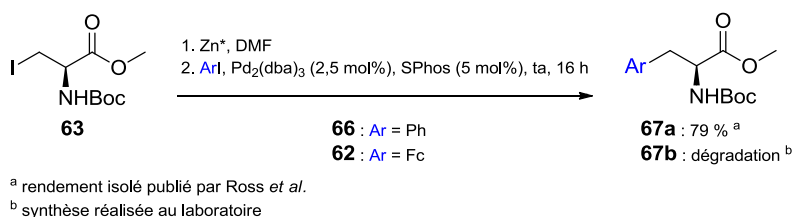


Schéma 59 : Couplage de type Negishi à partir du dérivé iodé **63.**¹⁷⁹

Malheureusement, l'analyse ¹H RMN du brut réactionnel n'a révélé aucun produit comportant un groupement ferrocényle : l'iodoferrocène s'est probablement dégradé dans ces conditions réactionnelles.

Ce couplage de type Negishi étant peu encourageant, nous nous sommes, par la suite, intéressés à un autre, de type Suzuki-Miyaura (Schéma 62), décrit pour fournir des rendements satisfaisants (66-92 %) à partir de dérivés alkyles halogénés inactivés, grâce à l'emploi de NiI₂ comme catalyseur.¹⁸⁰

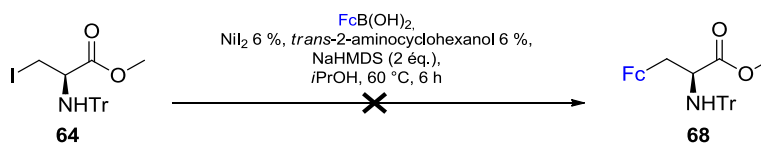


Schéma 60 : Couplage de type Negishi à partir du dérivé iodé **64 et employant NiI₂ comme catalyseur**¹⁸⁰.

Le produit attendu **68** n'a pu être obtenu dans ces conditions ; le mélange récupéré est complexe. De plus, contrairement à ce qui a été décrit dans la littérature,^{174,175} la présence d'une base telle que le NaHMDS n'a pas donné lieu à la formation de l'aziridine correspondante.

¹⁷⁶ C. Dugave, A. Menez *Tetrahedron: Asymm.* **1997**, 8, 1453-1465

¹⁷⁷ V. Swali, M. Matteucci, R. Elliot, M. Bradley *Tetrahedron*, **2002**, 58, 9101-9109

¹⁷⁸ R. J. Cherney, L. Wang *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2544-2546

¹⁷⁹ A. J. Ross, H. L. Lang, R. F. W. Jackson *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 245-248

¹⁸⁰ F. González-Bobes, G. C. Fu *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 5360-5361

Face à ces échecs en série optiquement active, notre stratégie s'est orientée vers une voie de synthèse accédant à un mélange racémique.

b. En série racémique

Dans un premier temps, un couplage de Heck a été réalisé afin de tirer profit de l'amino acrylate **42** obtenu précédemment (Schéma 61). Nous avons pour cela repris les conditions de couplage décrites par Carlström *et al.*¹⁸¹

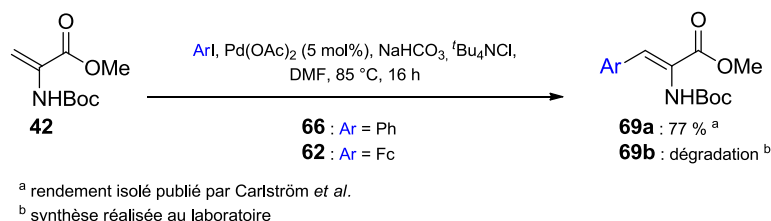


Schéma 61 : Couplage de Heck à partir de l'amino acrylate **42.**

Nous n'avons observé que des produits de dégradation. L'insuccès de cette réaction réside probablement en partie, à nouveau, dans l'instabilité de l'iodoferrocène.

A ce stade, une nouvelle voie d'accès au dérivé **53** a été proposée, comme indiqué Schéma 62.

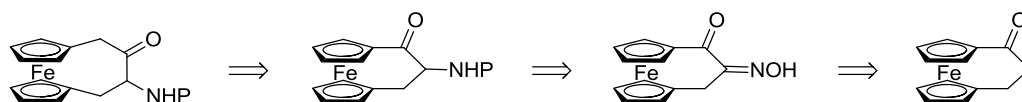


Schéma 62 : Analyse rétrosynthétique d'accès au dérivé **53 à partir de la ferrocénophanone **58**.**

Comme il a été vu précédemment, l'agrandissement de cycle peut s'effectuer selon les conditions proposées Schéma 54. L'accès au dérivé α -amino-cétone peut être obtenu par réduction de l' α -oxime en milieu zincique (Zn, HCOONH₄), conditions qui semblent tolérer un grand nombre de fonctions¹⁸² ou alors selon des conditions plus classiques d'hydrogénation au palladium (H₂, Pd/BaSO₄).¹⁸³ L'accès au précurseur α -oxime est possible en soumettant la ferrocénophanone **58** aux conditions proposées par Delgado *et al.*, dans le cas d'une α -tétralone.^{184,185} Malheureusement, les conditions utilisées (tBuOK et tBuONO) se

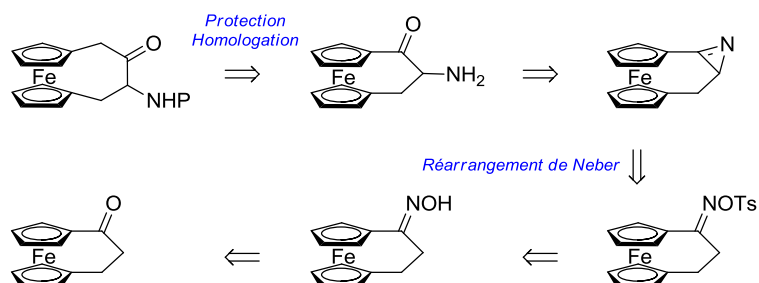
¹⁸¹ A.-S. Carlström, T. Frejd *Synthesis* **1989**, 6, 414-418

¹⁸² K. Abiraj, D. C. Gowda *J. Chem. Res. (S)* **2003**, 6, 332-334

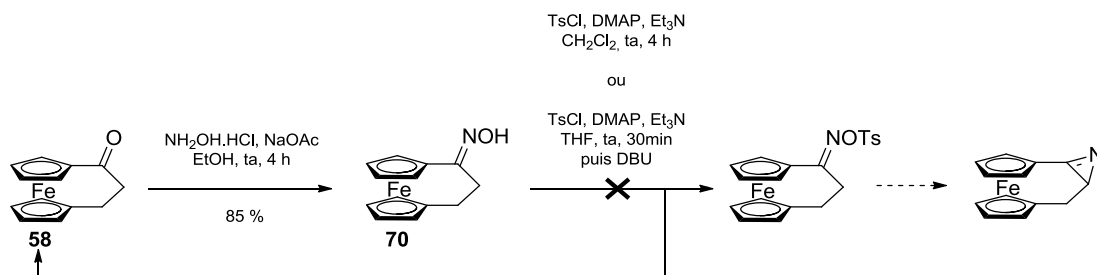
¹⁸³ R. I. Thrift *J. Chem. Soc. C : Organic* **1967**, 288-293

¹⁸⁴ A. Delgado, J. M. Garcia, D. M. C. Minguillon, J. R. Subirat, M. Feliz, F. Lopez, D. Velasc *Can. J. Chem.* **1988**, 66, 517-527

Une autre voie de synthèse, passant par une oxime et un réarrangement de Neber, a alors été envisagée (Schéma 63).¹⁸⁶



Alors que l'oxime a été obtenue aisément,¹⁸⁷ il n'a pas été possible d'isoler l'azirine correspondante (Schéma 64).



Bien que toutes les précautions aient été prises pour que le milieu réactionnel soit anhydre, la majorité du brut réactionnel s'est avéré constituée de ferrocénophanone **58**.

- La bromation en alpha de la cétone **58** en présence de NBS et TMSOTf, suivie de la formation d'un azoture à partir de NaN_3 pour finalement accéder à l'alpha amino-cétone correspondante par réduction.¹⁸⁸

¹⁸⁷ F. Portela-Cubillo, J. Lymer, E. M. Scanlan, J. S. Scott, J. C. Walton *Tetrahedron* **2008**, *64*, 11908-11916

- L'acylation de Friedel & Crafts avec le chlorure de 2-bromoacryloyle afin d'accéder directement à l' α -bromoferrocénophanone.

Ces derniers essais se sont malheureusement, une fois de plus, soldés par un échec. La synthèse de dérivés ferrocénophanone s'étant avérée particulièrement délicate, nous nous sommes tournés vers la préparation des composés de type amino-benzosubérone **54**, **55** et **56**.

2. Synthèse du dérivé **54**, **55** et **56**

L'accès aux dérivés **54**, **55** et **56** utilise les mêmes étapes réactionnelles et passe par un intermédiaire clé de type α -siloxy cétone, issu de la cétone correspondante, grâce à une oxydation de Rubottom au *m*CPBA (Schéma 65).

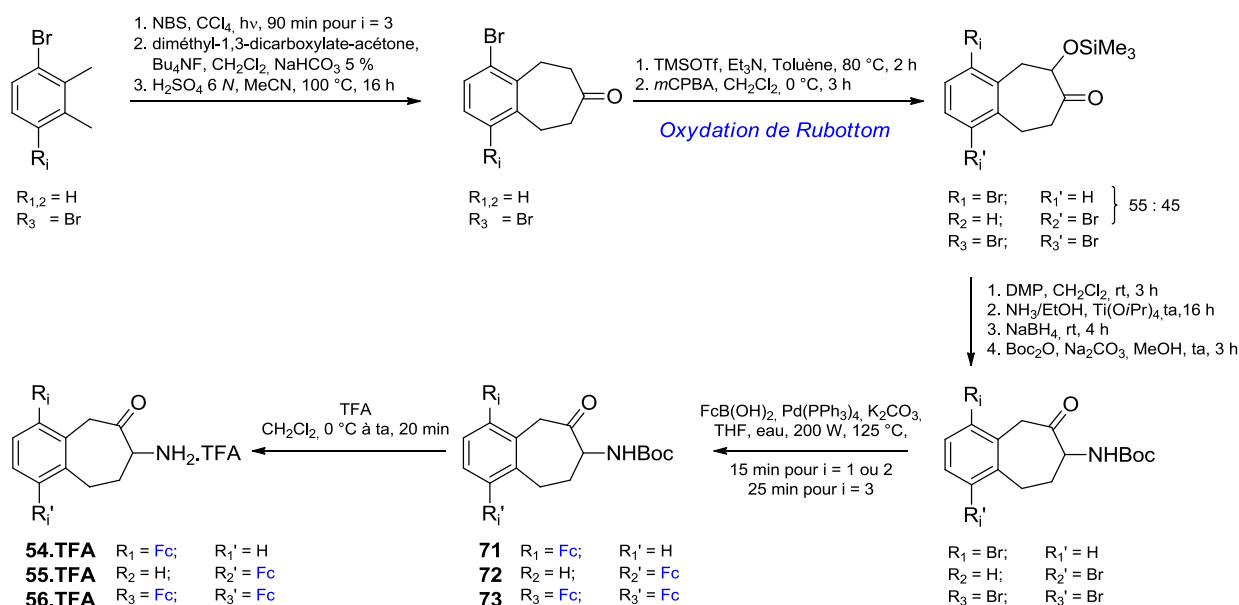


Schéma 65 : Accès aux dérivés **54**, **55** et **56** par une voie de synthèse utilisant un intermédiaire α -siloxy cétone clé.¹⁸⁹

La formation des précurseurs bromés a fait l'objet des travaux de thèse du Dr Mira Al-Lakkis,¹⁹⁰ nous nous intéressons ainsi essentiellement aux deux dernières étapes :

¹⁸⁸ S. Bertelsen, N. Halland, S. Bachmann, M. Marigo, A. Branton, K. A. Jørgensen *Chem. Comm.* **2005**, 4821-4823

¹⁸⁹ La partie expérimentale de ces schémas de synthèse est décrite dans la thèse de doctorat du Dr Mira Al-Lakkis Wehbe *Applications des dérivés d'amino-benzosubérone : inhibition sélective des aminopeptidases mono ou bimétalliques* **13 juin 2012**, UHA

- le couplage de type Suzuki-Miyaura en position 4
- la déprotection de la fonction NHBoc

a. Introduction du groupement ferrocényle grâce à un couplage de type Suzuki-Miyaura

L'accès aux dérivés **71**, **72** et **73** a été possible grâce à un couplage de Suzuki-Miyaura sous micro-onde (Schéma 65). Les rendements respectivement obtenus pour les dérivés **71**, **72** et **73** sont de 57, 53 et 49 %. Ces rendements moyens peuvent s'expliquer par l'obtention, jusqu'à 25 %, du produit de débromation présenté Figure 51.

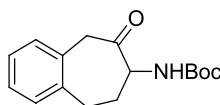


Figure 51 : Produit secondaire de débromation obtenu lors de la réaction de couplage de Suzuki-Miyaura.

Ce produit de débromation a pu être facilement séparé du composé diferrocényle **73** par chromatographie sur colonne. Néanmoins dans le cas des dérivés ferrocényles **71** et **72**, la purification s'est avérée beaucoup plus délicate.

Il serait judicieux de mener, par la suite, quelques expériences afin d'améliorer les rendements de ces couplages en faisant varier, par exemple, la quantité d'eau. Il a été vu en effet au chapitre II (cf. p. 81) pour des réactions similaires, qu'en divisant de moitié la proportion en eau, la quantité de produit de débromation était, elle aussi, divisée par deux.

b. Déprotection de la fonction NHBoc et études des contre-ions compatibles avec les composés comportant un groupement ferrocényle synthétisés au laboratoire

Jusqu'à présent, toutes les molécules ont été obtenues sous la forme d'un chlorhydrate d'ammonium. Or, d'un point de vue expérimental, il semblerait que le contre-ion Cl⁻ ne soit pas compatible avec la présence d'un groupement ferrocényle. De fait, dès lors qu'une solution d'HCl.Et₂O (2 M)¹⁹¹ est ajoutée à une solution contenant un dérivé NHBoc des composés **71**, **72** ou **73**, le milieu réactionnel, initialement orange, verdit graduellement faisant suspecter l'apparition d'espèce ferricinium. Les analyses ¹H RMN des chlorhydrates

¹⁹⁰ C. Maieureau, C. Schmitt, N. Schifano-Faux, D. Le Nouën, A. Defoin, C. Tarnus *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 5716-5733

¹⁹¹ Une solution fraîchement préparée et conservée à l'abri de la lumière a été utilisée

d'ammonium des dérivés ferrocényles **54.HCl**, **55.HCl** et **56.HCl** se sont avérée difficilement interprétables probablement lié à Fe^{3+} , espèce paramagnétique. Un élargissement, voire un aplanissement, des signaux des protons aromatiques et ferrocényles (généralement compris entre 4 et 5 ppm) est observé. Néanmoins les signaux des protons de la partie aliphatique restent à peu près intacts. Le spectre ^1H RMN (400 MHz, MeOD) du dérivé **54.HCl** enregistré peu après sa préparation est présenté Figure 52 pour mieux rendre compte de ce phénomène.

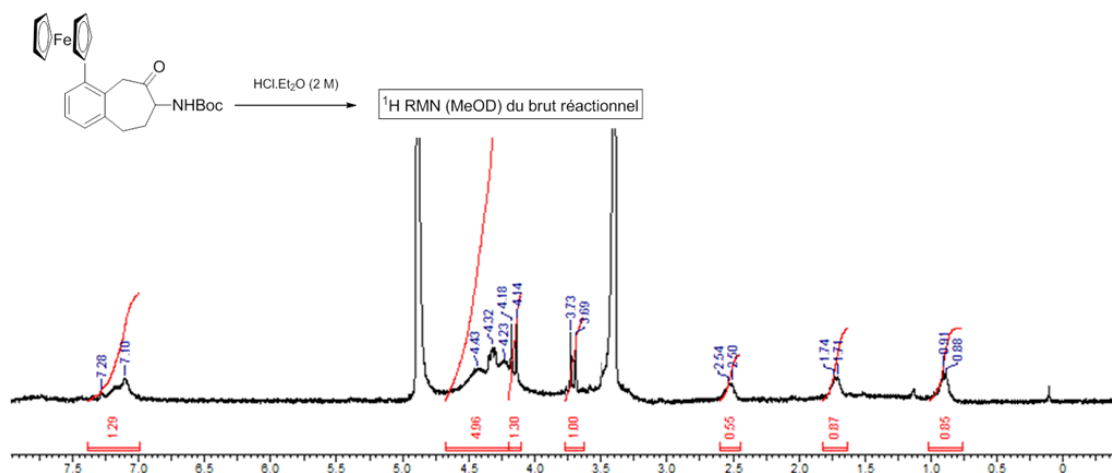


Figure 52 : Spectre ^1H RMN (400 MHz, MeOD) du dérivé **54.HCl**.

Lorsque l'analyse ^1H RMN est réitérée 24 h après, le spectre du chlorhydrate d'ammonium **54.HCl** devient ininterprétable car tous les signaux sont aplanis, y compris ceux de la partie aliphatique, laissant suggérer que le composé est entièrement, ou presque, sous forme de dérivé ferricinium.

Afin de tenter de pallier à ce problème, nous avons envisagé d'isoler l'ammonium sous forme d'acétate, de trifluoroacétate et de phosphate (Tableau 20).

Entrées	Contre-ion X	Conditions	$-\text{NH}_2\cdot\text{X}$ (2, 3 ou 4)
A	AcOH	MeCO_2H , CH_2Cl_2 , 0 °C à ta, 16 h	pas de réaction
B	H_3PO_4 ¹⁹²	H_3PO_4 (85 %), Toluène, 0 °C à ta, 16h	10 % ^a
C	$\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$	TFA, CH_2Cl_2 , 0 °C à ta, 20 min	quantitatif

^a déterminé à partir de l'analyse ^1H RMN

Tableau 20 : Etude des conditions de déprotection de la fonction NHBoc.

¹⁹² B. Marquez, R. Morris, L. Newell, S. Wunderwald, M. Witt, J. Weaver, Z. Zhang, Z. Zhang, *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 9045-9050

Il semblerait, d'après les essais préliminaires, que seules les conditions employant le TFA permettent de déprotéger efficacement la fonction Boc.

Néanmoins, afin de clarifier le problème posé par l'utilisation d'HCl.Et₂O, trois types d'expériences ont été menées:

- des essais de reprotection en dérivé NHBoc
- des cinétiques enzymatiques comparatives sur les dérivés **54.TFA** et **54.HCl**
- des analyses en voltamétrie cyclique, afin d'étudier leur comportement en phase oxydante

La première expérience est décrite Schéma 66.

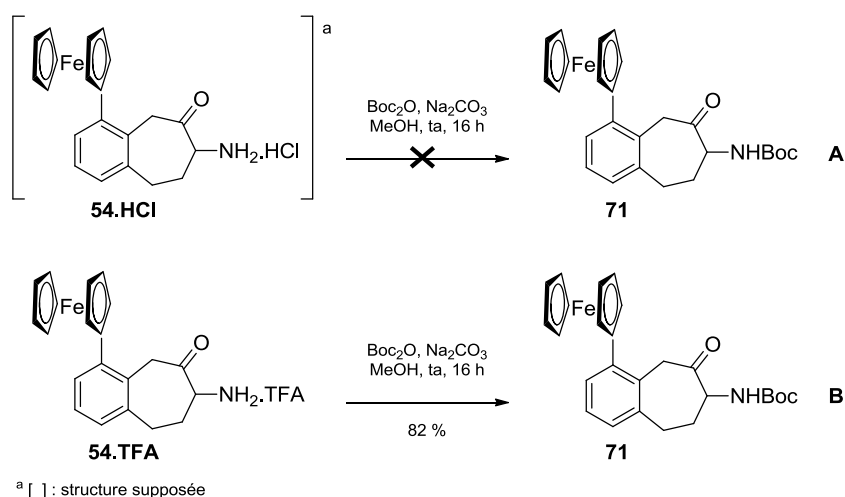


Schéma 66 : Essais de transformation (A et B) en dérivé NHBoc à partir des composés **54.HCl et **54.TFA**.**

La re-protection en dérivé NHBoc a été effectuée sur les dérivés **54.HCl** et **54.TFA** afin de s'assurer de l'intégrité des sels initialement formés. Alors que la reconversion du composé **54.TFA** en dérivé NHBoc **71** est quasi quantitative (Schéma 66B), aucun dérivé protégé n'a été isolé dans le cas du composé **54.HCl** (Schéma 66A).

Bien que la structure de **54.HCl** n'ait pas pu être confirmée, nous avons réalisé des expériences de cinétique sur enzyme pure, avec les dérivés **54.TFA** et **54.HCl** (fraîchement préparés) comme indiqué Tableau 21 ; des constantes d'inhibition similaires ont été obtenues dans les deux cas.

Composé ferrocényle	K_i (nM)
54.HCl	5 ^a
54.TFA	4

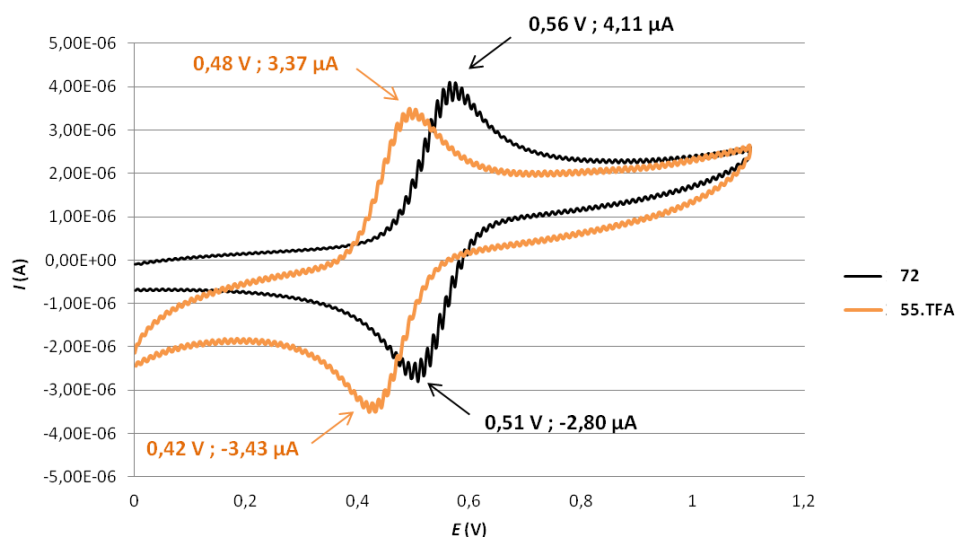
^a valeur calculée pour un inhibiteur compétitif $K_i = 0,5 \cdot IC_{50}$

Tableau 21 : K_i des dérivés 54.HCl et 54.TFA.

Ce résultat permet de supposer que la charpente moléculaire reste intacte et que le groupement ferrocényle serait encore présent mais sous une forme ferricinium.

Des expériences de voltamétrie cyclique ont été menées sur les sels d'ammonium modèles 55.TFA et 55.HCl, de comportement similaire en 1H RMN à 54.TFA et 54.HCl, en collaboration avec le Pr Alain Louati.¹⁹³

La Figure 53 présente les voltamogrammes des dérivés protégés NHBoc 72 et déprotégé 55.TFA.



[tbaPF6/MeCN] = 0,1 M, [72] = $5 \cdot 10^{-4}$ M, ajout de 20 μ L de TFA pour obtenir le voltamogramme de 55.TFA

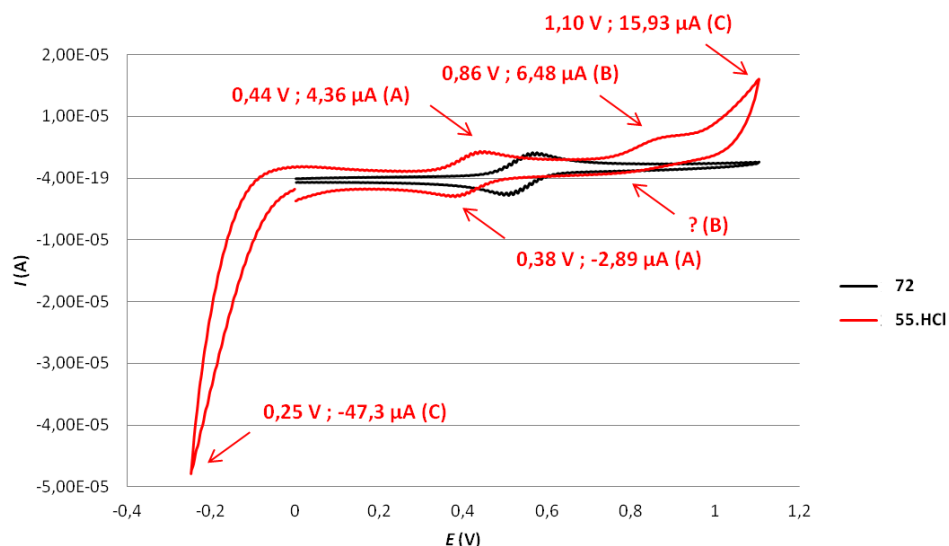
Figure 53 : Voltamétrie cyclique du composé 72 (courbe noire) et 55.TFA (courbe orange), vitesse de balayage $0,1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

Une seule vague d'oxydation ($\text{Fc} \rightarrow \text{Fc}^+ + e^-$), puis de réduction ($\text{Fc}^+ + e^- \rightarrow \text{Fc}$), a été observée sur ces deux dérivés 72 et 55.TFA. Leurs potentiels d'oxydation sont, par ailleurs, très proches : 0,56 V et 0,48 V respectivement. Le dérivé déprotégé (courbe orange) se déplace

¹⁹³ Les analyses en voltamétrie cyclique ont été réalisées en collaboration avec le Pr Alain Louati, dirigeant des recherches en électrochimie

cathodiquement, suggérant que la protonation de l'amine se fait avant l'oxydation du groupement ferrocényle.

Dès lors que l'étude porte sur le dérivé **55.HCl** présentée Figure 54 (courbe rouge), plusieurs vagues d'oxydation sont détectées (A, B et C) alors qu'une seule est normalement permise (A) pour le groupement ferrocényle.



[tbaPF6/MeCN] = 0,1 M, [**72**] = $5 \cdot 10^{-4}$ M, ajout de 20 μ L de HCl.Et₂O (2 M) pour obtenir le voltamogramme de **55.HCl**

Figure 54 : Voltamétrie cyclique du composé **72** (courbe noire) et **55.HCl** (courbe rouge), vitesse de balayage 0,1 V.s⁻¹.

La vague d'oxydation (B) présente deux particularités :

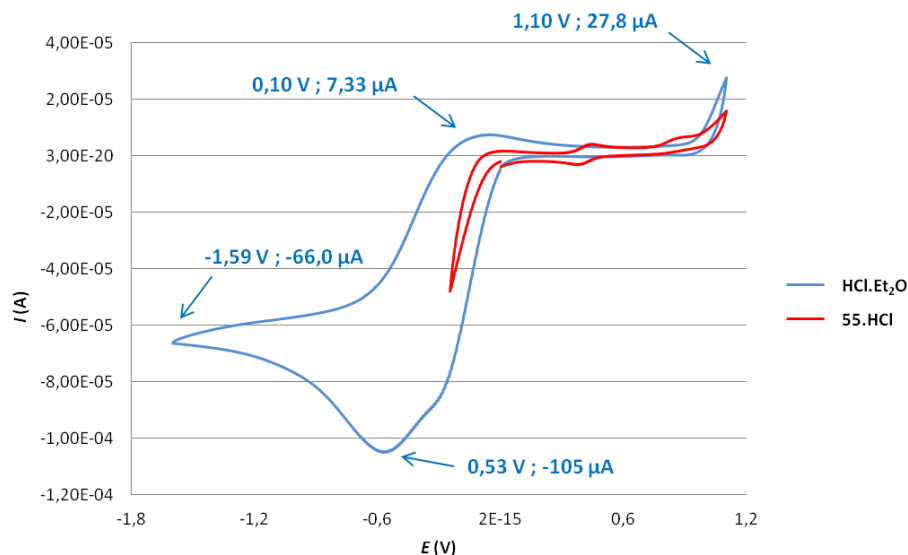
- elle pourrait correspondre à l'oxydation des ions chlorures, avoisinant un potentiel de 0,8 V dans ces conditions¹⁹⁴
- elle ne comporte pas de vague retour (ou alors le pic de réduction est tellement faible qu'il n'est pas détectable), laissant supposer qu'il s'agit d'un phénomène irréversible

Par ailleurs la vague dans la zone cathodique (C) démontre que la réduction des protons H⁺ (d'HCl.Et₂O) est très importante. Bien que l'acide (TFA ou HCl.Et₂O) ait été ajouté dans les mêmes quantités (20 μ L), la vague de réduction des protons H⁺ (de TFA) est très faible dans la Figure 53. Alors que le dérivé supposé **55.HCl** présente plusieurs vagues d'oxydation, il

¹⁹⁴ Information communiquée par le Pr Alain Louati

n'est pas possible de confirmer s'il s'agit réellement d'un produit dégradé. En effet la vague en partie anodique (A) a un pic d'oxydation de 0,44 V, valeur proche de ce qui a été obtenue dans le cas des composés **55.TFA** et **72** ; de plus a une intensité de 4,36 μA très similaire aux deux autres (respectivement de 4,11 μA et 3,37 μA).

Enfin, la Figure 55 présente le comportement redox d' $\text{HCl.Et}_2\text{O}$ (courbe bleue).



$[\text{tbaPF}_6/\text{MeCN}] = 0,1 \text{ M}$, 20 μL de $\text{HCl.Et}_2\text{O}$ (2 M) pour obtenir le voltammogramme bleu, celui de **55.HCl** est obtenu à partir de la Figure 54

Figure 55 : Voltamétrie cyclique de $\text{HCl.Et}_2\text{O}$ (courbe bleue) et **55.HCl (courbe rouge), vitesse de balayage 0,1 V.s⁻¹.**

Sa comparaison avec celui du dérivé supposé **55.HCl**, permet essentiellement d'expliquer l'importante vague de réduction.

Il ressort de cette étude que les trifluoroacétates d'ammonium sont plus stables dans le temps que les chlorhydrates correspondant. Ces derniers sont au moins en partie sous forme de ferricinium. Toutefois, l'apparition d'espèce ferricinium ne semble pas pour autant influencer leur pouvoir inhibiteur.

3. Synthèse du dérivé **57**

Deux voies d'accès ont été mises en place afin d'obtenir le dérivé **57** (Figure 56).

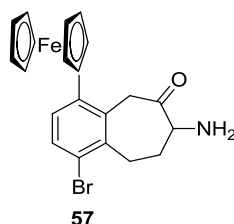


Figure 56 : Composé ferrocényle **57**.

- la première voie est une variante de la voie de recyclage (Schéma 11)
- la seconde voie utilise une stratégie partant d'un intermédiaire dibromé précurseur du dérivé diferrocényle **73** (Schéma 65)

a. Voie d'accès 1

Cette voie exploite les mêmes étapes réactionnelles décrites au chapitre II (cf. p.76) mais dans un ordre différent afin de tenir compte de la réactivité du groupement ferrocényle. En effet, ce dernier pouvant être sensible aux réactions d'oxydation, il est judicieux de l'introduire par couplage de Suzuki-Miyaura en fin de synthèse (Schéma 67).

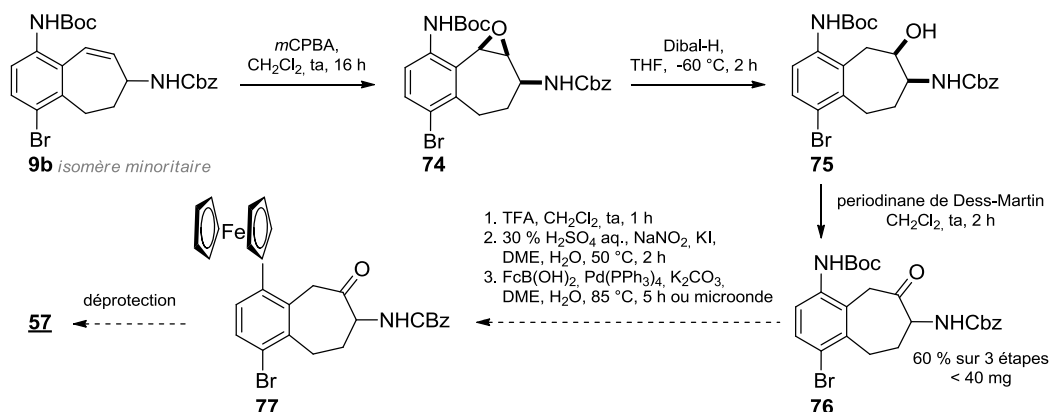


Schéma 67 : Voie de recyclage utilisée en vue de l'obtention du dérivé ferrocényle **57**.

Bien que nous ayons pu réaliser les 3 premières étapes réactionnelles avec un bon rendement global de 60 % (Schéma 67), les quantités disponibles en dérivé **9b** se sont avérées bien trop faibles pour aboutir au composé final **57**. En effet, ce dérivé **9b** a également servi à l'obtention de dérivés boranyles dans le cadre des travaux de thèse du Dr Lionel Roux.⁷¹ Cette voie d'accès reste néanmoins appropriée et mériterait d'être poursuivie par la suite.

b. Voie d'accès 2

A l'issue de la synthèse du dérivé diferrocényle **73**, une quantité suffisante du précurseur dibromé **73** était disponible pour tenter une réaction de monocouplage de type Suzuki-Miyaura en position 4 (Schéma 68).

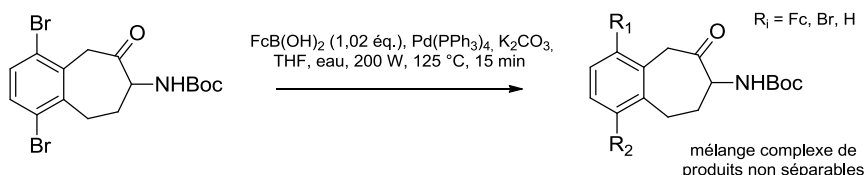


Schéma 68 : Couplage infructueux de type Suzuki-Miyaura.

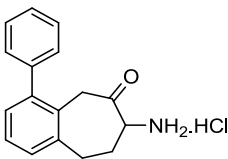
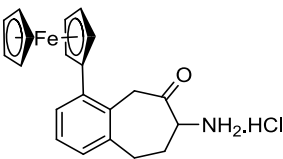
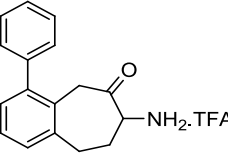
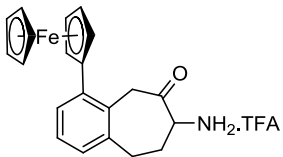
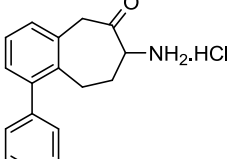
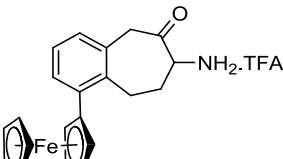
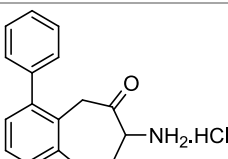
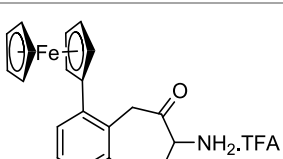
Cette réaction de couplage s'est avérée infructueuse, car elle donne lieu à un mélange complexe de produits ne renfermant que le produit souhaité en faible quantité.

B. Evaluation biologique d'une nouvelle génération de composés inhibiteurs de l'APN

1. Leur activité inhibitrice sur l'APN de porc

Les constantes d'inhibitions des dérivés phénylés et ferrocénylés ont été, en premier lieu, évaluées sur notre cible thérapeutique, l'APN d'origine porcine (obtenue par purification de reins de porc). Des descripteurs physico-chimiques, classiquement utilisés pour le criblage à haut débit de molécules biologiquement actives,¹⁹⁵ ont également été employés afin de mieux situer la nouvelle génération de composés en série ferrocényle (Annexe 6). Alors que le dérivé phényle n'a été synthétisé, jusqu'à présent, que sous la forme d'un chlorhydrate, le dérivé ferrocényle, quant à lui, est relativement stable sous la forme d'un trifluoroacétate. Dans un souci de rigueur, il a donc été nécessaire de synthétiser le sel trifluoroacétate du dérivé phénylé pour une meilleure interprétation des résultats sur enzyme et *in vitro* qui s'en suivront (Tableau 22).

¹⁹⁵ S. Schultes, C. De Graaf, E. E. J. Haaksma, I. J. P. De Esch, R. Leurs, O. Krämer *Drug Disc. Today : Technol.* **2010**, 7, 157-162

Analogues phényles	Inhibition	Analogues ferrocényles	Inhibition
 1b.HCl	$K_i = 7 \text{ nM}$ $N = 19$ $cLogP = 2,41$ $LE = 0,60$ $LLE = 5,33$ $LELP = 4,02$	 54.HCl	$K_i = 5 \text{ nM}^a$ $N = 24$ $cLogP = 3,76$ $LE = 0,48$ $LLE = 4,24$ $LELP = 7,83$
 1b.TFA	$K_i = 12 \text{ nM}^a$ $N = 19$ $cLogP = 2,41$ $LE = 0,58$ $LLE = 5,21$ $LELP = 4,15$	 54.TFA	$K_i = 4 \text{ nM}$ $N = 24$ $cLogP = 3,76$ $LE = 0,49$ $LLE = 4,54$ $LELP = 7,67$
 78.HCl	$K_i = 251 \text{ nM}$ $N = 19$ $cLogP = 2,41$ $LE = 0,49$ $LLE = 3,86$ $LELP = 4,92$	 55.TFA	$K_i = 196 \text{ nM}$ $N = 24$ $cLogP = 3,76$ $LE = 0,39$ $LLE = 2,61$ $LELP = 9,64$
 79.HCl	$K_i = 41 \text{ nM}$ $N = 25$ $cLogP = 4,15$ $LE = 0,41$ $LLE = 2,91$ $LELP = 10,12$	 56.TFA	$K_i = 250 \text{ nM}^a$ $N = 35$ $cLogP = 6,85$ $LE = 0,26$ $LLE = -0,55$ $LELP = 26,35$

^a valeur calculée pour un inhibiteur compétitif $K_i = 0,5 \cdot IC_{50}$

Tableau 22 : valeurs de K_i et descripteurs physico-chimiques ($cLogP$, LE , LLE , $LELP$) (définitions et formules décrites en Annexe 6) des analogues phénylés et ferrocényles déterminés à partir d'études cinétiques sur enzyme pure de l'APN de rein de porc.

L'analyse de ces résultats confirme que le groupement ferrocényle est un bon isostère du groupement phényle car les valeurs de K_i de ces deux séries de composés sont, dans l'ensemble, très similaires. Néanmoins, dès lors que l'efficacité de ligand (LE) est prise en compte, le dérivé **54** est le seul composé de la série ferrocényle à posséder une LE supérieure 0,4 ; valeur minimum considérée pour la suite de l'étude.

A la lecture du graphe présentant la corrélation entre le potentiel inhibiteur d'une série de dérivés synthétisés au laboratoire et leur valeur de lipophilie calculée $cLogP$ (Figure 57), un groupe de ligands approche les propriétés physico-chimiques recherchées (zone délimitée par un arc de cercle gris) : K_i de l'ordre du nanomolaire et une lipophilie modérée ($cLogP$ autour de 3). Dans cette zone, figure le dérivé **54** (quelque soit le contre-ion) : son pouvoir inhibiteur le classe parmi les composés les plus puissants vis-à-vis de l'APN.

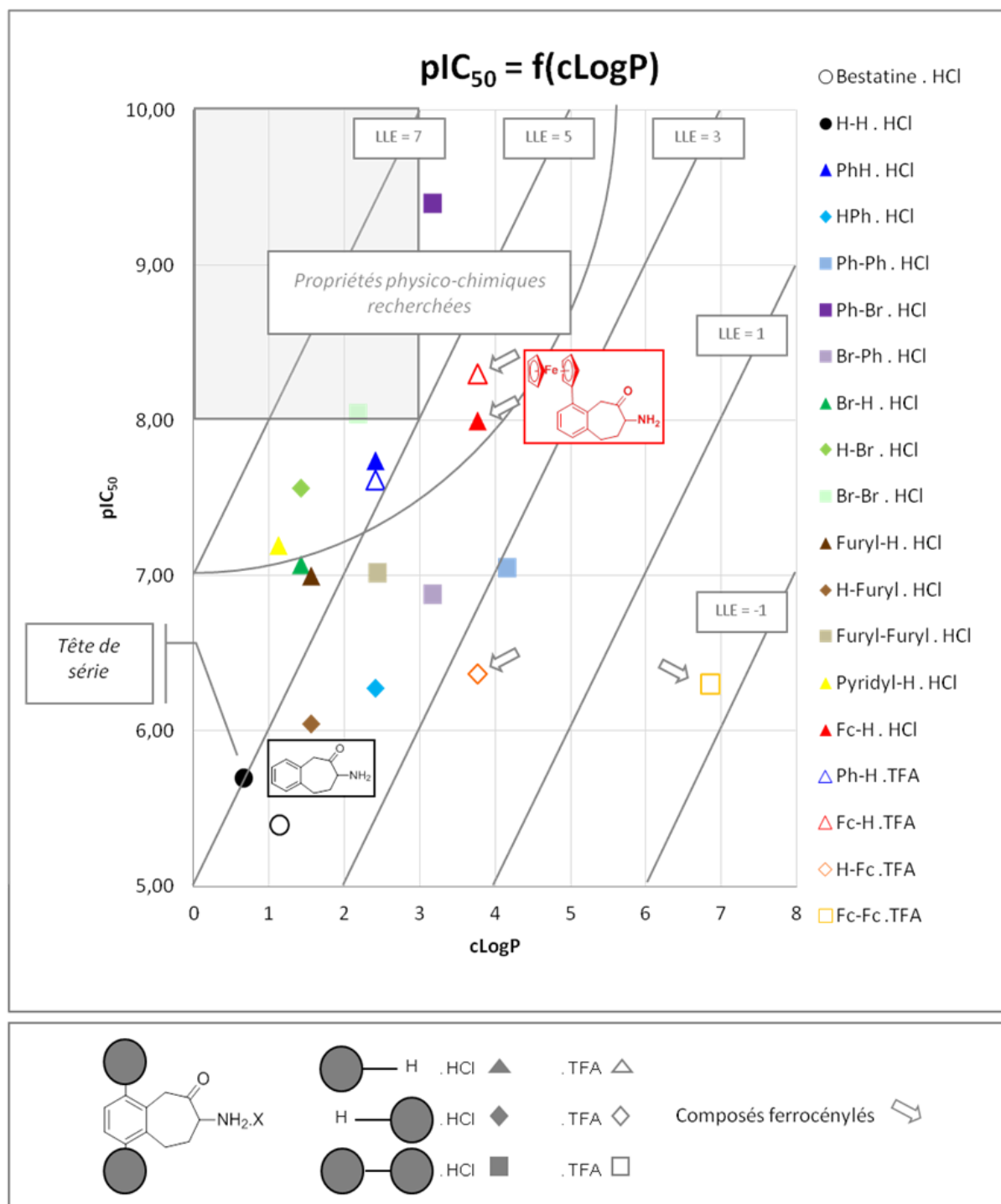


Figure 57 : Corrélation entre le potentiel inhibiteur de ligand de l'APN et leur valeur calculée cLogP - délimitation des zones LLE de -1 à 7.

Toutefois la lipophilie plus élevée, apportée par le groupement ferrocényle, doit être considérée. Elle peut influencer sur de nombreux paramètres et présenter des avantages comme des inconvénients tels que ceux présentés dans le Tableau 23.

avantages	inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> - L'augmentation de l'affinité de liaison : favorisant les interactions avec les poches hydrophobes du site actif de l'enzyme. - L'augmentation de la perméabilité membranaire : favorisant sa biodisponibilité. 	<ul style="list-style-type: none"> - L'augmentation de l'inhibition des cytochromes P-450 : importante famille d'enzyme dont la principale fonction est de métaboliser tout les xénobiotypes ; peut donner lieu à des métabolites inactifs voire toxiques. - L'augmentation du volume de distribution : représente la quantité totale de la substance active présente dans les tissus de l'organisme sur sa concentration plasmatique. Son importante exposition peut engendrer une promiscuité pharmaceutique <i>i.e.</i> une compétition avec d'autres protéines. - La diminution de la solubilité du composé. Un composé présentant une activité remarquable mais ayant une mauvaise solubilité en phase aqueuse, est difficilement considéré comme molécule chef de file. Outre ce problème cela engendre de nombreux autres inconvénients tels qu'une trop forte affinité pour les tissus adipeux impliquant une diminution de sa biodisponibilité.

Tableau 23 : Avantages et inconvénients pour l'utilisation de composés lipophiles.¹⁹⁶

Bien qu'une lipophilie plus importante fût prévisible pour les dérivés ferrocényles, le gain en activité cytotoxique pourrait compenser l'éventuelle perte de solubilité. Cette dernière étant un paramètre physico-chimique important, elle sera discutée de manière plus approfondie dans le point suivant.

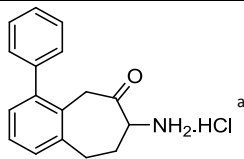
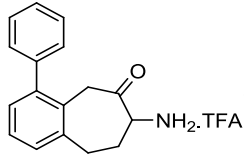
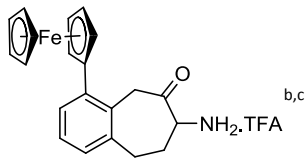
2. Etude de solubilité¹⁹⁷

La solubilité des dérivés ferrocényle et phénylés a été déterminée par analyse HPLC. Ces deux séries de composés sont comparées (Tableau 24) :

- D'une part, est évaluée la solubilité du composé en fonction de la nature du substituant greffé *i.e.* phényle ou ferrocényle.
- Et d'autre part, il est important de vérifier l'éventuelle influence du contre-ion chlorure (Cl⁻) ou trifluoroacétate (TFA⁻) vis-à-vis de la solubilisation et la solubilité du produit.

¹⁹⁶ E. H. Kerns, L. Di, *In Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods, from ADME to Toxicity Optimization*, Academic Press Elsevier, **2008**

¹⁹⁷ La détermination des solubilités par HPLC est un travail co-réalisé avec Aurélie Marin, doctorante au laboratoire.

Molécule (masse molaire)	Solubilité molaire (mM) Solubilité massique (mg/L) t = 0 h	Solubilité molaire (mM) Solubilité massique (mg/L) t = 24 h
 1b.HCl (287,78 g/mol)	1,245 ± 0,192 358 ± 55	0,117 ± 0,015 34 ± 04
 1b.TFA (365,35 g/mol)	1,065 ± 0,120 389 ± 44	0,147 ± 0,033 54 ± 12
 54.TFA (473,29 g/mol)	0,262 ± 0,020 124 ± 10	0,046 ± 0,006 22 ± 03

^a solution saturée réalisée dans une solution tampon phosphate PBS à 0,15 M, pH = 7,4 et 0,25 % de DMSO - longueur d'onde de détection λ = 254 nm

^b solution saturée réalisée dans une solution tampon phosphate PBS à 0,15 M, pH = 7,4 et 0,5 % de MeOH - longueur d'onde de détection λ = 275 nm

^c la solubilité du dérivé **54.HCl** n'a pu être déterminée car les quantités disponibles n'étaient plus suffisantes

Tableau 24 : Solubilité molaire (et massique) à T = 0 h et 24 h des dérivés phénylés et ferrocénylés déterminés par HPLC (cf. Partie Expérimentale p. 175)

Les informations majeures à tirer de ces résultats sont les suivantes :

- La nature du contre-ion Cl^- ou TFA^- semble n'avoir que peu d'influence sur la solubilité du produit à $t = 0$. La faible différence observée proviendrait du fait que le dérivé chlorhydrate ait tendance à se dissoudre plus rapidement que son analogue trifluoroacétate.
- Le remplacement d'un groupement phényle par un ferrocényle fait chuter considérablement (4-5 fois) la solubilité du produit. Expérimentalement, la formation d'un précipité est visible dès la mesure à $t = 0$ à une concentration de 0,262 mM pour le dérivé **54.TFA**. Ce phénomène n'est pas observé dans le cas du dérivé phénylé.
- Quelle que soit la nature du groupement, la solubilité à 24 h décroît (jusqu'à 10 fois). En effet, la valeur de pH de la solution tampon est à 7,4 ; or le pK_a d'un groupement amino en α d'une cétone avoisine également cette valeur ($\approx 6-7$). L'amine se trouve alors sous deux formes à l'équilibre : protonée et non protonée. L'homodimérisation, déjà observée

lors de travaux précédents⁴⁸ et initialement décrite sur la colchicine,¹⁹⁸ s'effectue facilement à des concentrations de l'ordre du mM (Schéma 69) :

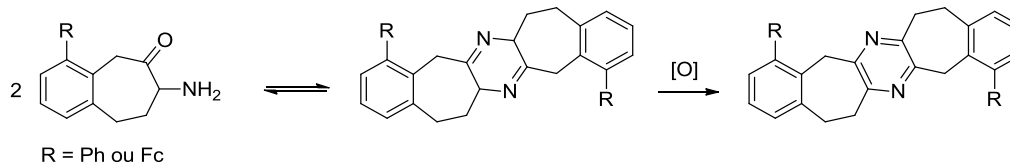


Schéma 69 : Formation du dimère à pH neutre et à des concentrations de l'ordre du mM.

- Lorsque la concentration en soluté est plus importante à $t = 0$, la solubilité à 24 h se verra davantage diminuée. Ce phénomène peut se justifier par l'homodimérisation favorisée à de fortes concentrations. Ainsi la solubilité à 24 h est moindre pour le dérivé **1b.HCl** (117 mM) vis-à-vis de son analogue **1b.TFA** (147 mM). De même, la solubilité du dérivé **54.TFA**, plus faible (262 mM) à $t = 0$, ne diminue que modérément (46 mM) à $t = 24$ h.

La solubilité maximale étudiée ici est le reflet du comportement qu'adopterait le composé dans des conditions physiologiques *e.g.* avant injection pour des études *in vivo*. Néanmoins, la classe de composés sur laquelle le laboratoire travaille, a des constantes d'inhibition de l'ordre du nanomolaire voire subnanomolaire. Les solubilités à $t = 24$ h, répertoriées dans le Tableau 24, sont nettement supérieures à la valeur de leur K_i (facteur 10^4). De toute évidence ces concentrations n'auront jamais besoin d'être atteintes lors d'études *in vitro*.

De ce fait, la faible solubilité du dérivé ferrocényle ne constituerait pas un effet limitant lors de son utilisation pour l'étude de cytotoxicité qui suit.

3. La cytotoxicité des dérivés ferrocényles

De l'étude précédente il ressort que seul le dérivé **54** est le candidat retenu pour évaluer sa potentielle cytotoxicité.

Une étude *in vitro* sur la lignée de cellules cancéreuses HT1080 (fibrosarcome), exprimant fortement l'APN, a été menée par Aurélie Marin, doctorante au laboratoire,¹⁹⁹ afin de comparer la toxicité des composés **1b.HCl**, **1b.TFA**, **54.HCl** et **54.TFA** (Tableau 25).

¹⁹⁸ G. L. Buchanan, J. K. Sutherland *J. Chem. Soc.* **1957**, 2334

¹⁹⁹ Thèse de doctorat : Dr Aurélie Marin *Evaluation d'inhibiteurs sélectifs de type aminobenzosubérone et études pilotes en oncologie* **2 décembre 2013**, UHA

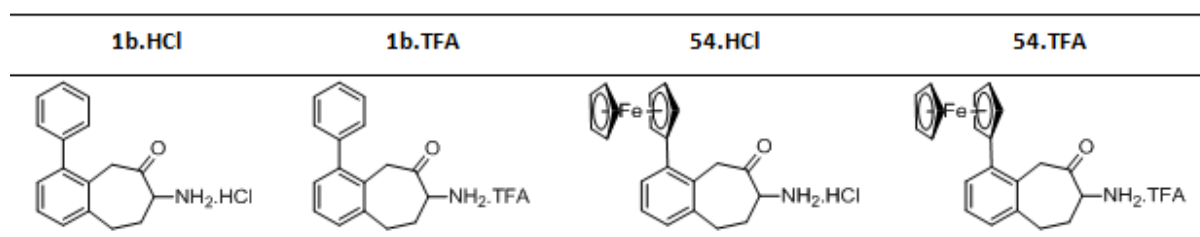


Tableau 25 : Composés étudiés dans le cadre des études de cytotoxicité.

Les cellules ont été traitées sur 24 h, sur une gamme de concentration allant de 0 à 100 μM en inhibiteur, puis récupérées pour analyse au bleu de trypan (Figure 58).²⁰⁰

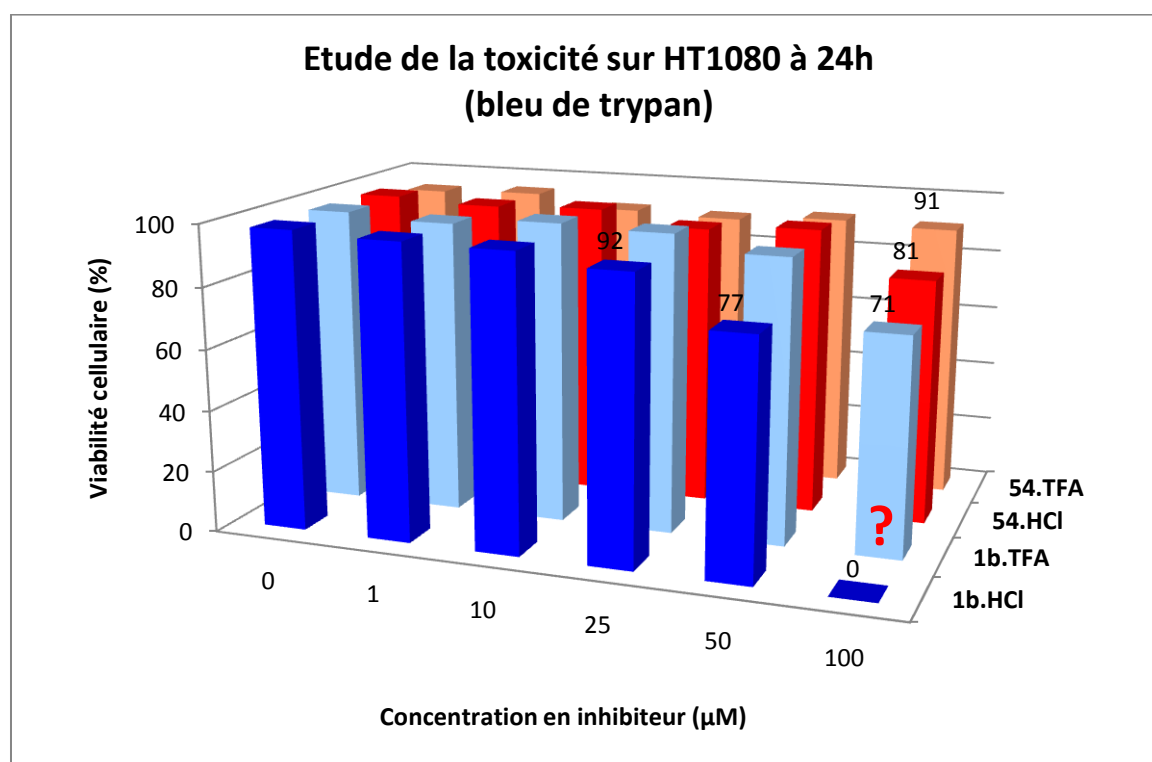


Figure 58 : Etude de la toxicité des dérivés 1b.HCl, 1b.TFA, 54.HCl et 54.TFA sur HT1080, après 24 h d'incubation et analyse au bleu de trypan.

L'analyse de ces résultats démontre d'une part que seul le dérivé 1 est toxique à 100 μM sur les cellules HT1080 (0 % de viabilité cellulaire) et d'autre part que le remplacement du groupement phényle par un ferrocényle n'apporte pas de toxicité additionnelle. La nature du contre-ion semble, par ailleurs, influencer étonnamment sur la viabilité cellulaire. Les dérivés ayant un contre-ion TFA^- ont, ici, une cytotoxicité moins importante que leurs analogues Cl^- . Cependant, alors que cette différence est faible entre les dérivés 54.HCl et 54.TFA, celle

²⁰⁰ Dénombrement des cellules endommagées avec un colorant d'exclusion par comptage en cellule de Malassez

obtenue entre les dérivés **1b.HCl** et **1b.TFA** n'est pas rationnelle. En effet, il semblerait peu probable, que le contre-ion seul puisse avoir un tel effet sur la viabilité cellulaire.

Dans le but de clarifier ce résultat, une analyse de la toxicité sur les cellules HT1080 a été, cette fois-ci, effectuée au bleu de méthylène (Figure 59).²⁰¹

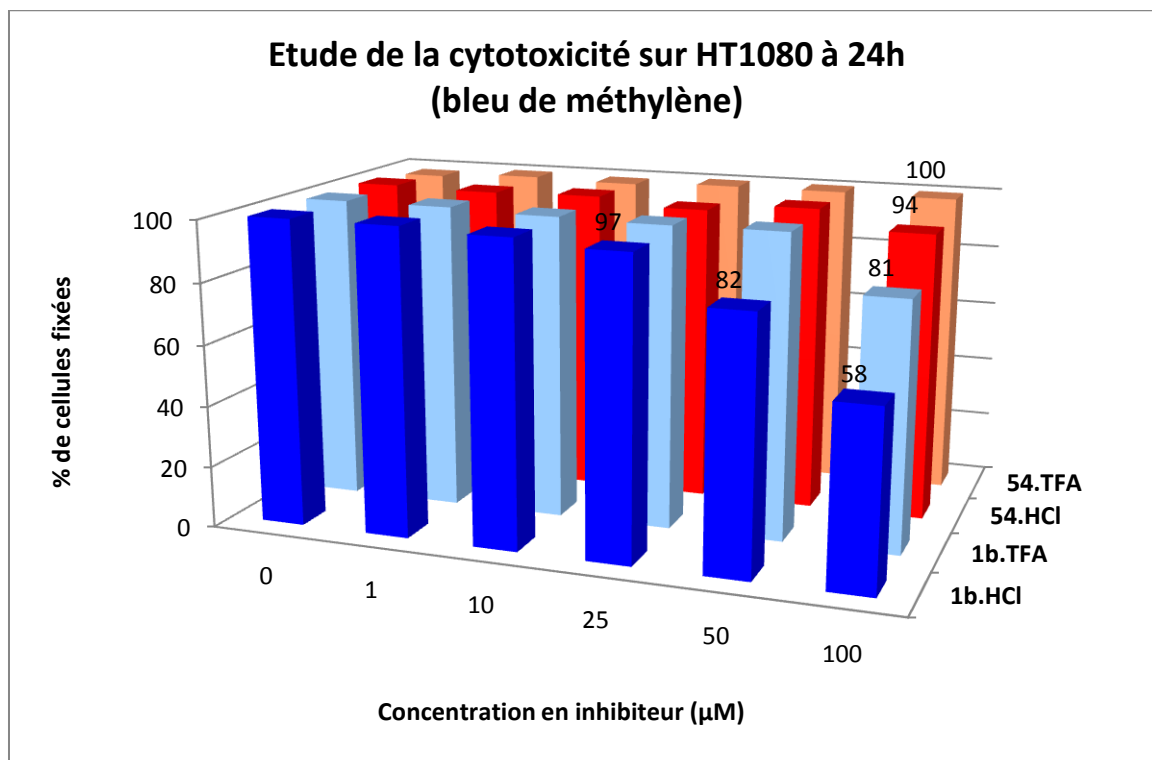


Figure 59 : Etude de la toxicité des dérivés **1b.HCl**, **1b.TFA**, **54.HCl** et **54.TFA** sur HT1080, après 24 h d'incubation et analyse au bleu de méthylène.

Bien que le résultat, obtenu après traitement au bleu de méthylène, semble, *a priori*, plus cohérent dans le cas du dérivé phénylé, une différence de toxicité reste observable (Figure 60). Une explication raisonnable ne peut toutefois pas être apportée pour justifier cette différence de toxicité.

Toutefois ces analyses préliminaires restent entièrement valables car les prises de vue des cellules en culture (avant traitement au bleu de trypan ou de méthylène) semblent confirmer la cytotoxicité cellulaire dans le cas du dérivé **1b.HCl** (Figure 60).

²⁰¹ Fixation des cellules en culture et coloration au bleu de méthylène puis dosage de la densité optique à 661 nm

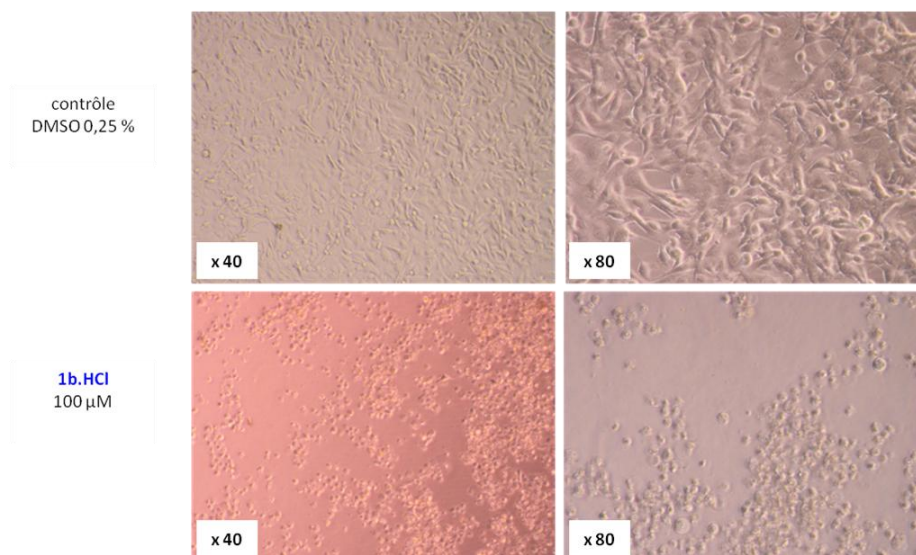


Figure 60 : Photos des HT1080 en culture en plaque 24 puits après 24 heures d'incubation avec **1b.HCl** (100 µM), grossissements x 40 et x 80.

Les cellules traitées à 100 µM de **1b.HCl** et incubées durant 24 h (grossissement x 80) présentent une modification significative du cytosquelette : elles sont de formes arrondies. Une perte totale d'adhésion intercellulaire est également observée : les cellules sont en état de mort cellulaire. Ces observations semblent, d'ailleurs, davantage corroborer avec le résultat obtenu après analyse au bleu de trypan (*i.e.* aucune viabilité cellulaire).

Après avoir mis en évidence les effets de ces inhibiteurs sur les cellules HT1080, nous avons enfin voulu nous assurer qu'un éventuel effet cytotoxique du dérivé ferrocényle, n'apparaissait pas dans le temps. Une nouvelle série d'analyse sur des cellules traitées à 50 µM de **54.TFA** et incubées sur des périodes de 24, 48 et 72 h est présentée Figure 61.

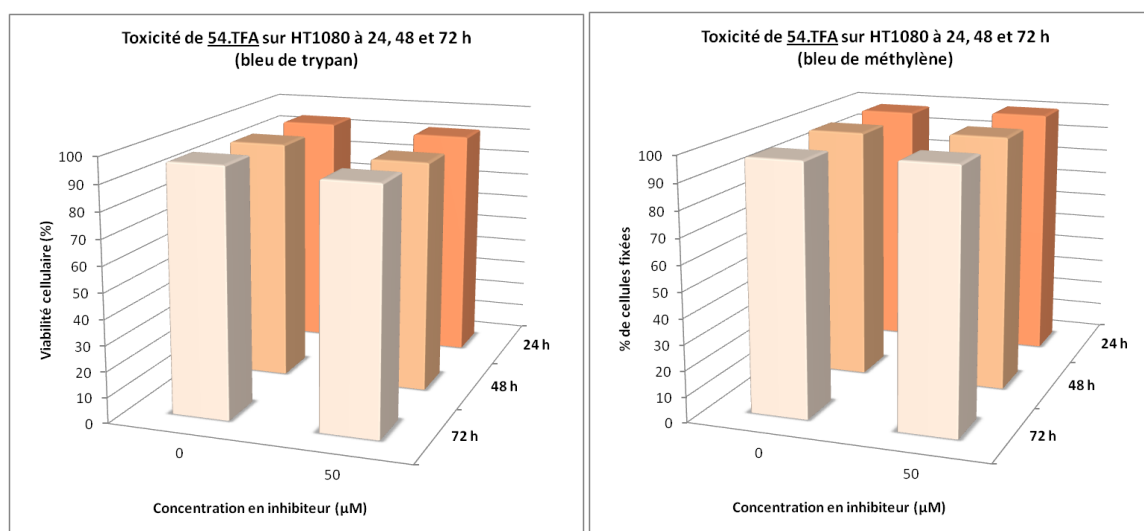


Figure 61 : Etude de la toxicité du dérivé **54.TFA** sur HT1080, après 24, 48 et 72 h d'incubation et analyse au bleu de trypan et méthylène.

Bien que le **54.TFA** soit aussi puissant et sélectif que son analogue phénylé, il ne présente malheureusement pas de réels effets cytotoxiques même sur des périodes plus longues.

Cette absence d'effet pourrait être expliquée par l'absence d'endocytose de la molécule dans la cellule. En effet, l'APN, récepteur membranaire, ne permet pas seule d'internaliser rapidement les inhibiteurs se fixant au niveau de son site actif. Or il a été vu précédemment, que l'action cytotoxique semble se produire qu'à proximité du noyau.

4. L'activité inhibitrice du dérivé **54** sur l'APN d'*E. coli*

Disposant au laboratoire, de l'APN d'*E. coli*, nous avons également souhaité tester l'activité inhibitrice du dérivé ferrocénylé **54** sur cette enzyme qui a été comparée à celle des analogues de la série phénylée (Tableau 26).

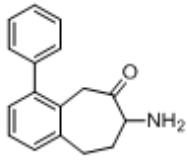
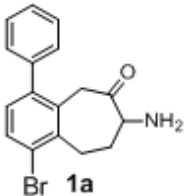
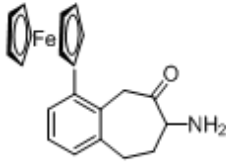
			
K_i APN porcine	7 nM	0,06 nM	4 nM
K_i APN <i>E. coli</i>	330 nM	34 nM	60 nM

Tableau 26 : Comparaison des activités inhibitrices des dérivés d'amino-benzosubérone sur l'APN porcine et d'*E. coli*.

Alors que les analogues **54** et **1b** inhibent l'APN porcine avec la même puissance, le dérivé ferrocénylé inhibe, quant à lui, 5 fois plus l'APN d'*E. coli* que l'analogue phénylé.

A ce jour, le complexe APN *E. coli*-**54** n'a pu être obtenu, mais celui de l'APN *E. coli*-**1a** permet d'émettre d'ores et déjà des hypothèses quant au mode de liaison qu'adopterait le dérivé ferrocénylé **54** dans le site actif (Figure 62).

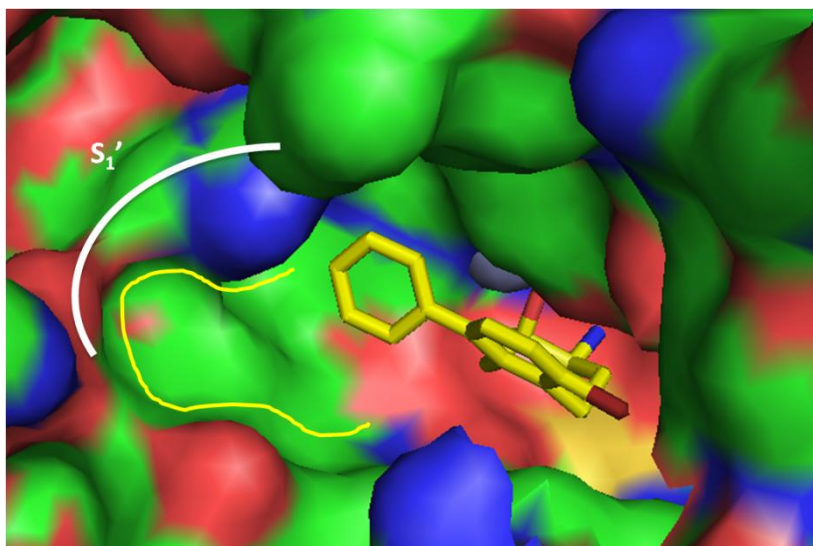
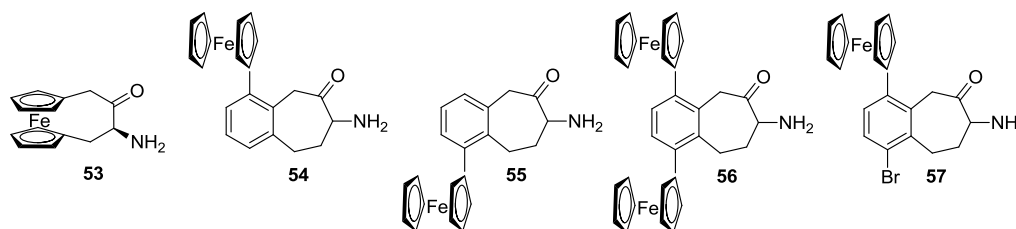


Figure 62 : Complexe APN *E. coli-1a* : occupation du groupement phényle dans la poche S₁'.

L'entrée de la poche S₁', dans cette enzyme, semble offrir un espace suffisant pour accueillir le groupement ferrocényle du composé 54. Les interactions mises en jeu pourraient être alors soit de nature hydrophobe soit de type « π -stacking ».

III. Conclusion

Trois dérivés ferrocényles **54**, **55** et **56** ont été obtenus avec succès à l'issue de synthèses mettant en jeu chacune pas moins de 10 étapes réactionnelles. Alors que la préparation du dérivé **53** semble plus difficile à mettre en œuvre, celle du dérivé **57** demande à être finalisée car les étapes réactionnelles restantes ont déjà été largement étudiées dans le cadre de dérivés analogues.



Les études d'inhibition des dérivés **54**, **55** et **56**, indiquent que cette nouvelle génération de composés est, non seulement active à des concentrations nanomolaires mais a également permis de confirmer que le groupement ferrocényle est un bon isostère du groupement phényle car les K_i de ces deux séries d'analogues sont semblables sur l'APN porcine.

Néanmoins les résultats de cytotoxicité du dérivé **54**, inhibiteur le plus puissant de la série ferrocényle ($K_{i(\text{porcine})} = 4 \text{ nM}$), semblent indiquer qu'il ne soit pas un candidat efficace pour engendrer des effets délétères sur les cellules tumorales.

En revanche, sur l'APN d'*E. coli* le caractère isostère du groupement ferrocényle n'est plus vérifié : le dérivé **54** possède un K_i cinq fois plus petit que son analogue **1b**. Les valeurs d'inhibition des dérivés **54** et **1a** sont, par ailleurs, du même ordre de grandeur, respectivement de 60 et 34 nM. Compte tenu de ces résultats, nous pouvons prédire que le dérivé **57** devrait être l'inhibiteur le plus puissant sur l'APN d'*E. coli*.

Toutefois, il est à noter qu'il n'y a pas d'intérêt majeur thérapeutique à inhiber l'APN d'*Escherichia coli* car elle est une enzyme non essentielle au développement de la bactérie. L'inhiber n'atteindrait donc pas sa survie. Néanmoins, comme nous avons pu le voir dans le Chapitre I (cf. p. 28), cette enzyme possède de nombreux orthologues dont fait partie l'APN de *Plasmodium falciparum* (PfA-M1), parasite responsable du paludisme. Le devenir de cette nouvelle famille de composés ferrocénylés pourrait bien s'orienter vers une application thérapeutique antiparasitaire, telle que le traitement antipaludéen. Cette voie est actuellement suivie au sein de notre équipe dans le cadre d'une collaboration avec le Pr Isabelle Florent, qui dirige des travaux de recherche au sein de l'équipe de *Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes - Biologie fonctionnelle des protozoaires* (UMR 7245 – CNRS/ Muséum National des Histoires Naturelles - Paris).

CONCLUSION GENERALE

A l'issu de ces travaux de thèse, 4 voies de synthèse ont été réalisées en vue de l'obtention des dérivés **1a**, **54**, **55** et **56**, tous inhibant l'APN à des concentrations nanomolaires voire subnanomolaires (Schéma 70).

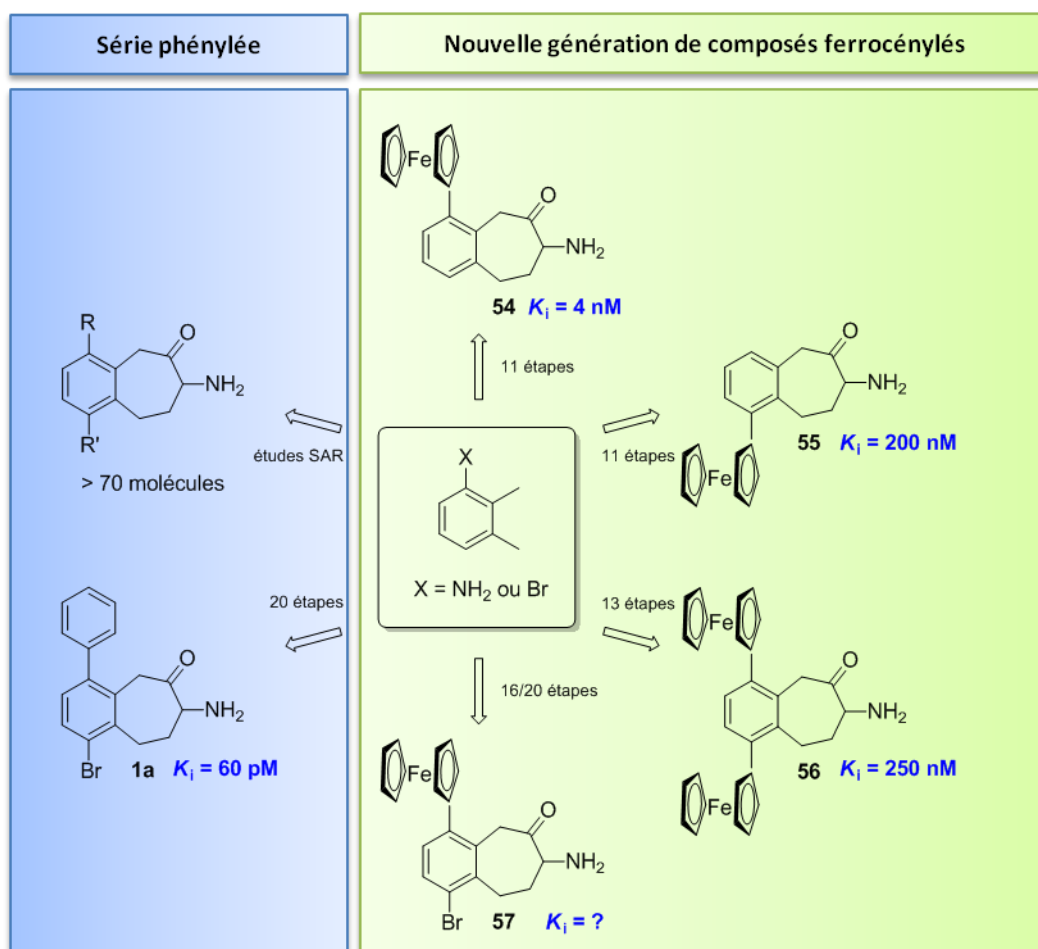


Schéma 70 : Dérivés d'aminobenzosubérone en série phénylée et ferrocényle.

L'accès au dérivé **1a** en quantités suffisantes pour effectuer les premières études in vivo, n'a été possible, dans le cadre de cette thèse, qu'avec la voie originellement décrite (Schéma 71A).

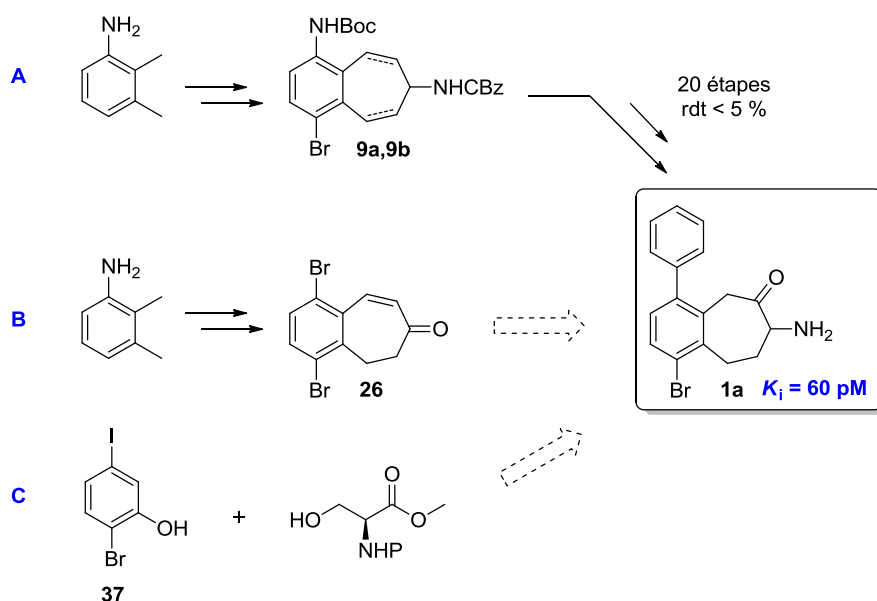


Schéma 71 : Les 3 voies d'accès au dérivé **1a** développées dans cette thèse.

Le non aboutissement des deux autres voies (Schéma 71B) et (Schéma 71C) ne remet pas en question leur faisabilité. Elles mériteraient, en effet, notamment pour la voie C, d'être étudiées jusqu'à l'objectif final tout en y apportant les améliorations nécessaires pour un développement à l'échelle du multigramme.

Des trois dérivés ferrocényles **54**, **55** et **56**, le deuxième est celui qui possède la meilleure constante d'inhibition. Néanmoins son évaluation in vitro sur la lignée cancéreuse HT1080 montre que l'introduction d'une entité ferrocényle ne semble pas apporter une cytotoxicité additionnelle. Cependant il demeure un composé intéressant dans l'optique de préparer des complexes APNs-**54**. L'intérêt de ces complexes serait double :

- L'analyse RX du complexe APN E. coli-**54** permettrait de comprendre les interactions induites par le groupement ferrocényle et responsables de la forte inhibition sur cette enzyme (60 nM).
- A ce jour, aucun complexe APN-ligand ferrocényle n'a été obtenu.

Enfin, La synthèse du dérivé **57** est en phase d'être achevée. Les étapes restantes ont déjà été étudiées lors de synthèses analogues. Ce composé devrait probablement inhiber l'APN, au même titre que l'inhibiteur **1a**, à des concentrations subnanomolaires.

Par ailleurs, la pharmacomodulation de molécules biologiquement actives par l'introduction d'un groupement ferrocényle pourrait constituer une alternative intéressante pour pallier aux problèmes de recrudescence des résistances aux traitements antipaludéens. Une nouvelle cible biologique, orthologue de l'APN, est étudiée au laboratoire : PfA-M1. Les

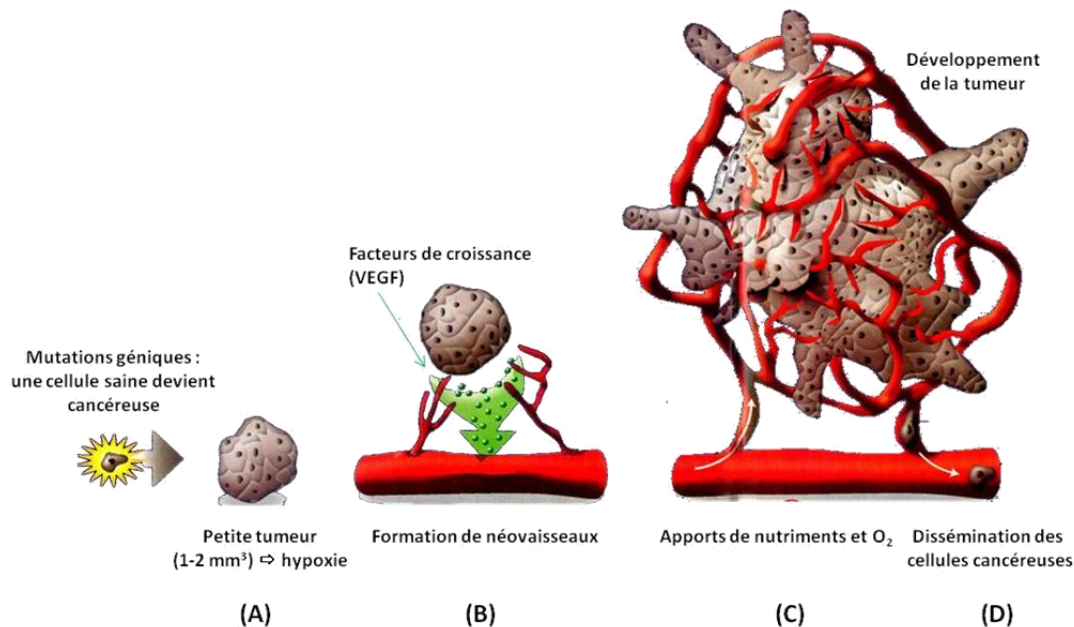
Conclusion générale

premières études d'inhibition, sur la croissance du parasite (souches 3D7 et FcB1), effectuées sur des dérivés d'amino-benzosubérone en séries phénylée et ferrocénylée, sont prometteuses. Ces deux classes de composés possèdent, en effet, des valeurs d'inhibition de l'ordre du μM .

La conception, la synthèse et l'évaluation des inhibiteurs de la nouvelle cible font l'objet des travaux de thèse de Bérénice Chaillou, doctorante au laboratoire.

ANNEXES

Annexe 1 : L'angiogenèse tumorale²⁰²

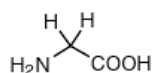


Lorsqu'une cellule saine subit une mutation génique (*e.g.* stress, irradiation, tabac, ...), elle est considérée comme cancéreuse dès lors que son volume atteint 1 à 2 mm³. Jusqu'à ce stade, la simple diffusion passive des éléments essentiels à sa survie (*i.e.* nutriments et O₂) suffit à son développement. Dès lors que l'amas de cellules cancéreuses devient trop important, le cœur de la tumeur n'est plus alimenté par diffusion et par voie de conséquence les cellules entrent en état d'hypoxie (A). Pour assurer leur survie, les cellules tumorales sécrètent alors des facteurs de croissance *e.g.* VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) qui vont stimuler les cellules endothéliales provoquant le développement d'un nouveau réseau de vaisseaux associés à la tumeur et lui permettant ainsi de recevoir l'oxygène et les nutriments (C). L'angiogenèse tumorale permet ainsi d'irriguer non seulement le cœur de la tumeur mais également sa périphérie (D). Des cellules peuvent se détacher de la tumeur primaire de manière isolée ou groupée et emprunter les voies sanguines pour venir s'implanter dans d'autres organes et ainsi initier le développement d'une tumeur secondaire appelée métastase (E). Ce sont ces métastases qui sont, dans la grande majorité des cas, à l'origine de la mort du patient.

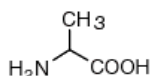
²⁰² Dr Mouad Alami Simplicité et efficacité en thérapie antivasculaire, JCB **2012**, ENSCMu - Mulhouse

Annexe 2 : Liste des acides aminés - nomenclature en 1 et 3 lettres

Small

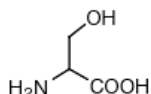


Glycine (Gly, G)
MW: 57.05

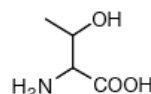


Alanine (Ala, A)
MW: 71.09

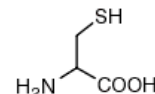
Nucleophilic



Serine (Ser, S)
MW: 87.08, pK_a ~ 16

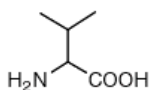


Threonine (Thr, T)
MW: 101.11, pK_a ~ 16

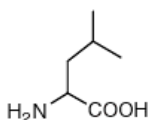


Cysteine (Cys, C)
MW: 103.15, pK_a = 8.35

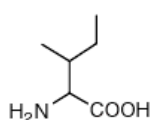
Hydrophobic



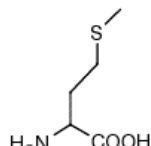
Valine (Val, V)
MW: 99.14



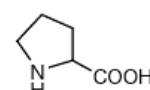
Leucine (Leu, L)
MW: 113.16



Isoleucine (Ile, I)
MW: 113.16

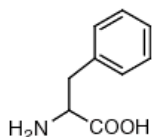


Methionine (Met, M)
MW: 131.19

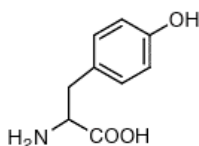


Proline (Pro, P)
MW: 97.12

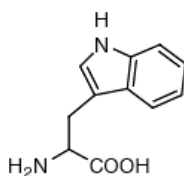
Aromatic



Phenylalanine (Phe, F)
MW: 147.18

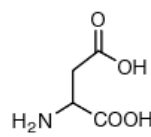


Tyrosine (Tyr, Y)
MW: 163.18

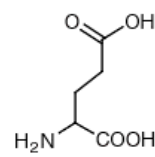


Tryptophan (Trp, W)
MW: 186.21

Acidic

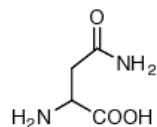


Aspartic Acid (Asp, D)
MW: 115.09, pK_a = 3.9

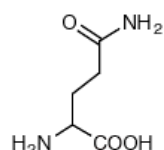


Glutamic Acid (Glu, E)
MW: 129.12, pK_a = 4.07

Amide

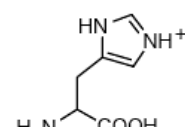


Asparagine (Asn, N)
MW: 114.11

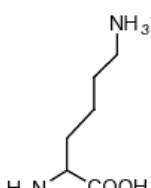


Glutamine (Gln, Q)
MW: 128.14

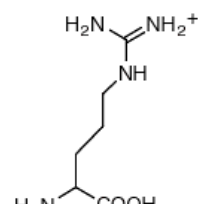
Basic



Histidine (His, H)
MW: 137.14, pK_a = 6.04

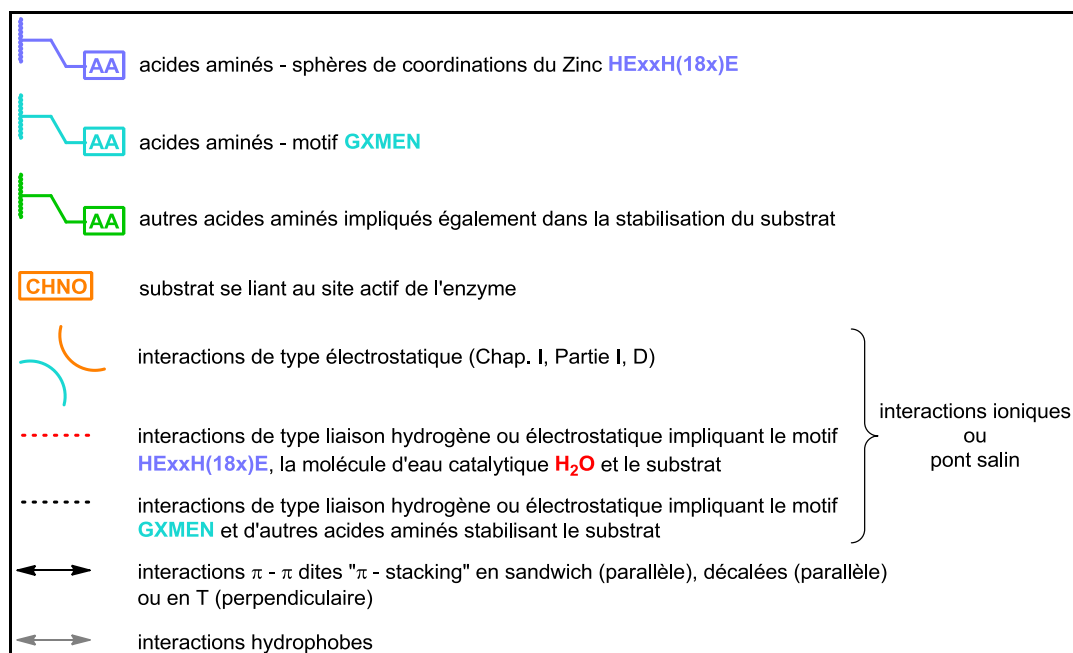


Lysine (Lys, K)
MW: 128.17, pK_a = 10.79

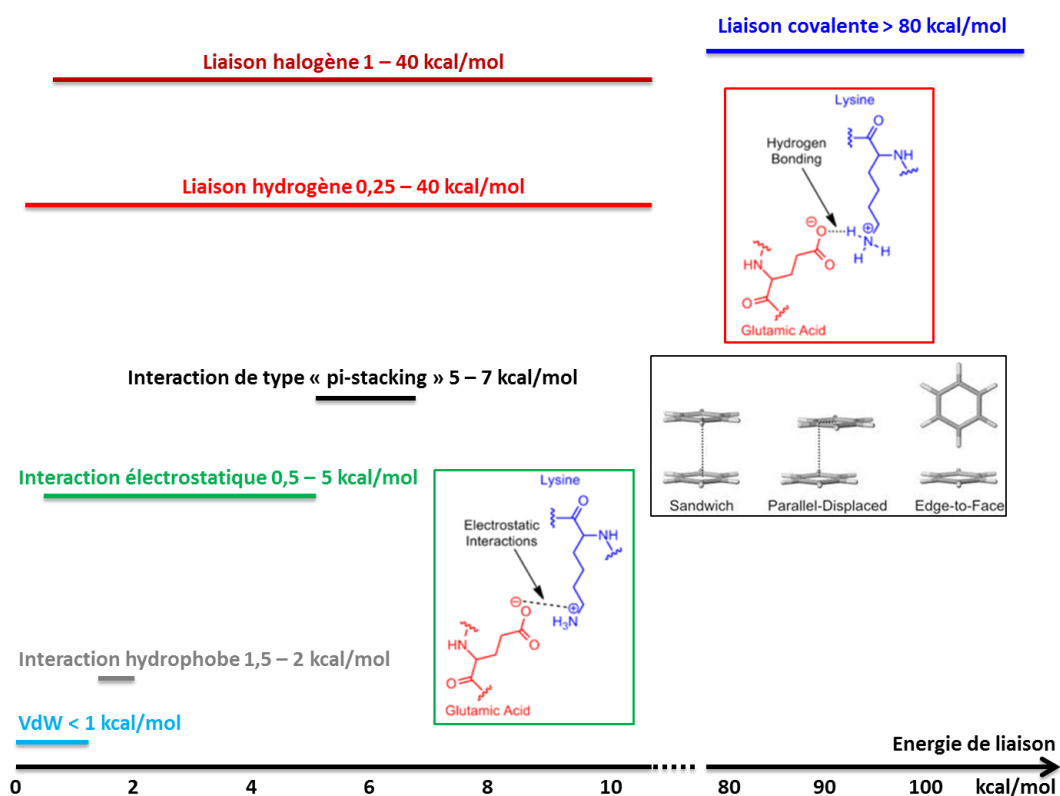


Arginine (Arg, R)
MW: 156.19, pK_a = 12.48

Annexe 3 : Légende et codes couleurs s'appliquant à l'ensemble des figures expliquant les modes de liaisons des substrats à l'enzyme

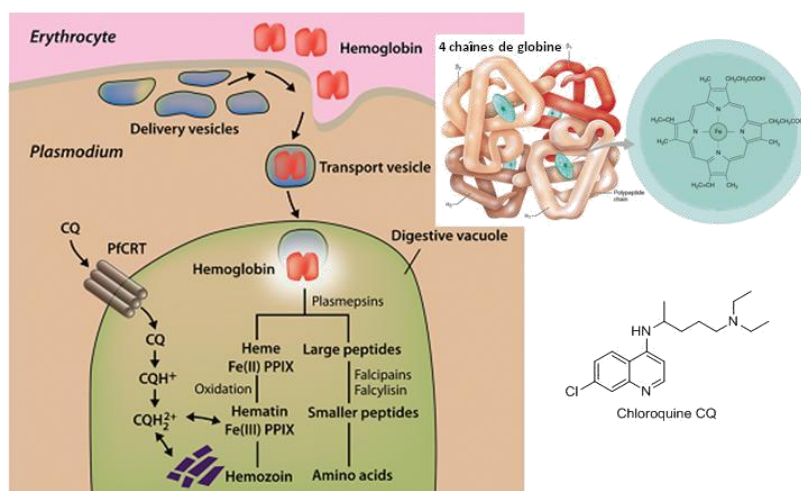


Annexe 4 : Spectre d'énergie des différentes interactions rencontrées au sein des biomolécules²⁰³



²⁰³ P. Zhou, J. Lv, J. Zou, F. Tian, Z. Shang *Journal of structural biology* **2010**, 169, 172-182

Annexe 5 : Le Paludisme



Représentation schématisée d'assimilation de l'hémoglobine et du principe de détoxification par formation d'hémozoïne dans la vacuole digestive du parasite et son interaction avec la chloroquine.^{204,205}

Plasmodium falciparum est un agent pathogène responsable du paludisme. Le catabolisme de l'hémoglobine, par le parasite, produit les acides aminés essentiels à sa survie. L'hème ou ferriprotoporphyrine Fe(II)PPIX qui la constitue est toxique pour le parasite, sa vacuole digestive dans laquelle est polymérisée l'hémozoïne non toxique est alors son organelle indispensable. Bloquer la formation de ce polymère est la stratégie de choix pour lutter contre le paludisme. Le mode d'action de la chloroquine CQ (traitement antipaludéen) est basé sur la pénétration de la molécule dans la vacuole digestive et sur son accumulation grâce à la protonation des amines (pH de la vacuole $\approx 4,5$), perturbant ainsi le processus de détoxification²⁰⁶. Elle forme un complexe avec Fe(III)PPIX via des interactions π - π empêchant la polymérisation et fragilisant *in fine* la membrane plasmique du parasite²⁰⁷.

Au début des années 60, une résistance à la chloroquine est observée. Elle semblerait être liée à des modifications génétiques au niveau des pompes d'efflux PfCRT (Chloroquine Resistant Transporter) qui empêchent l'accumulation de la chloroquine, éliminant ainsi son action²⁰⁸.

²⁰⁴ P. F. Salas, C. Herrmann, C. Orvig *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 3450-3492

²⁰⁵ <http://legacy.owensboro.kctcs.edu/gcaplan/anat2/notes/APIINotes6%20Blood%20RBC.htm> consulté le 7 juillet 2013

²⁰⁶ S. Vangapandu, M. Jain, K. Kaur, P. Patil, S. R. Patel, R. Jain *Med. Res. Rev.*, **2007**, *27*, 65-107

²⁰⁷ E. W. McChesney, C. D. Fitch, ed. by W. Peters, W. H. G. Richards In *Antimalarial Drug II, Handbook of Experimental Pharmacology: Current Antimalarials and New Drug developments* ; Springer: Berlin Heidelberg, **1984**, Volume 68 / 2, p. 3-60

²⁰⁸ J. E. Hyde, *FEBS J.*, **2007**, *274*, 4688-4698

Annexe 6 : Les descripteurs physico-chimiques et formules associées

Paramètres	Nom	Formule	Remarque
K_i	Constante d'inhibition	-	la plus faible possible
HA	Nombre d'atome ≠ hydrogène	-	-
cLogP ²⁰⁹	Indice de lipophilie de la molécule déterminé <i>in silico</i>	calcul effectué sur le service web Molinspiration utilisant principalement un algorithme de Rekker	0 < cLogP < 3
LogP ²¹⁰	Indice de lipophilie de la molécule déterminée par la méthode « shake-flask »	$\frac{[\text{soluté}]_{\text{oct}}}{[\text{soluté}]_{\text{eau}}}$ coefficient de partage octanol/eau	cLogP = LogP ± 0,2
LE	Efficacité de ligand	$\frac{\Delta G}{N}$ $\Delta G = -RT \ln(X) = -1,4 \text{ Log}$ $X = IC_{50} \text{ ou } K_i$	LE > 0,4
LLE	Ligand-Lipophilicity Efficiency	pIC ₅₀ - cLogP	Evalue l'affinité d'un ligand vis-à-vis de sa lipophilie
LELP ²¹¹	Ligand Efficiency dependent LiPophilicity	cLogP / LE	0 < LELP < 7,5

- La lipophilie du ligand (LogP : méthode expérimentale, cLogP : méthode dite « calculée » *in silico*) : cette valeur donne une indication de la lipophilie d'un composé en milieu physiologique. Le ferrocène a une valeur de LogP égale à 3,54, supérieure à son isostère benzénique (Tableau 27). L'introduction d'un groupement ferrocényle à la place d'un phényle au sein d'une molécule résultera d'une augmentation de sa lipophilie globale défavorisant ainsi sa solubilité en milieu aqueux.

Composé	LogP ²¹⁰
Biphényle	4,01
→ Ferrocène	3,54
Naphtalène	3,30
Benzène	2,13
Cyclopentadiène	1,89
Butanone	0,29
Diméthylformamide	-1,01

Tableau 27 : Exemples de groupements chimiques et leur valeur de LogP (déterminée empiriquement).

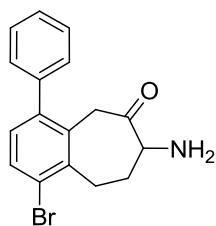
²⁰⁹ Programme : Molinspiration 21 06 2013

²¹⁰ M. H. Abraham, N. Benjelloun-Dakhama, J. M. R. Gola, W. E. Acree Jr., W. S. Cain, J. E. Cometto-Muniz *New J. Chem.* **2000**, 24, 825-829

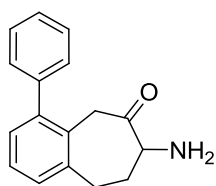
²¹¹ <http://practicalfragments.blogspot.fr/2009/04/lelp-fragments-reach-their-potential.html>

- L'efficacité de ligand (LE) : elle rend compte de l'énergie d'affinité de liaison ligand-protéine par atome de ligand. Pour un K_i élevé et un faible nombre d'atome, la LE est optimale.
- L'affinité de ligand en fonction de la lipophilie (LLE) : intégrée dans un graphe présentant l' IC_{50} en fonction de cLogP, cette valeur reflète l'inhibition liée à sa contribution lipophile (Figure 57). Dans le cadre de notre étude, une LLE de 7 serait optimale *i.e.* un IC_{50} subnanomolaire et un LogP autour de 3.
- Le LELP (*Ligand-Lipophilicity Efficiency*), est un facteur présentant l'avantage d'intégrer deux paramètres essentiels (cLogP et LE) en une unique valeur. Pour des LELP proches, la LE est ensuite privilégiée pour la classification.

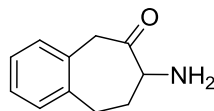
Annexe 7 : Liste des principaux intermédiaires et dérivés finaux synthétisés



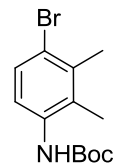
1a C₁₇H₁₆BrNO
330,22



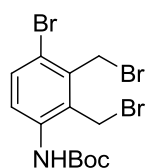
1b C₁₇H₁₇NO
251,32



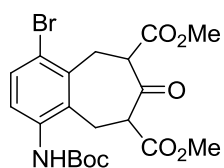
1c C₁₁H₁₃NO
175,23



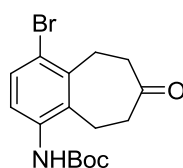
2 C₁₃H₁₈BrNO₂
300,19



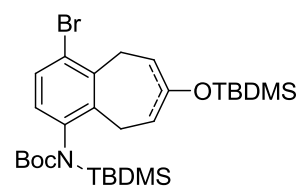
3 C₁₃H₁₆Br₃NO₂
457,98



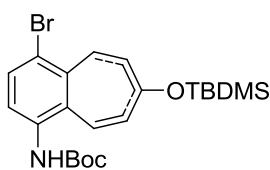
4 C₂₀H₂₄BrNO₇
470,31



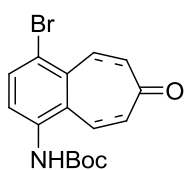
5 C₁₆H₂₀BrNO₃
354,24



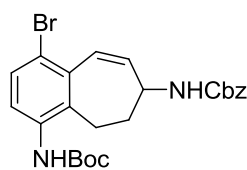
6a,b C₂₈H₄₇BrNO₃Si₂
581,75



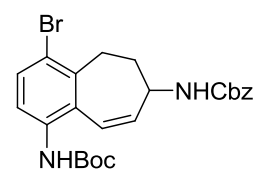
7a,b C₂₂H₂₉BrNO₃Si
463,46



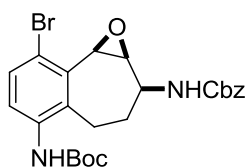
8a,b C₁₆H₁₆BrNO₃
350,21



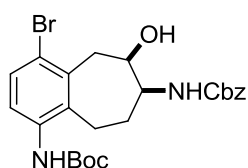
9a C₂₄H₂₇BrN₂O₄
487,39



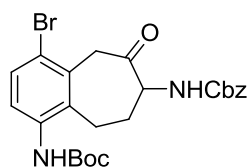
9b C₂₄H₂₇BrN₂O₄
487,39



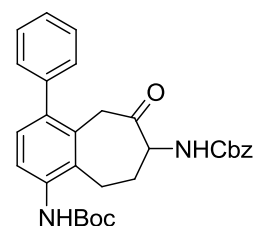
10 C₂₄H₂₇BrN₂O₅
503,39



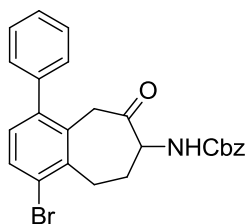
11 C₂₄H₂₉BrN₂O₅
505,40



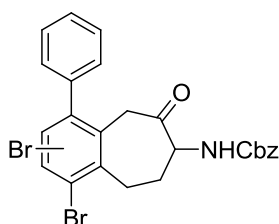
12 C₂₄H₂₇BrN₂O₅
503,39



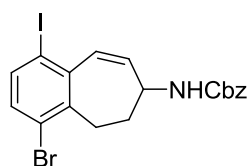
13 C₃₀H₃₂N₂O₅
500,59



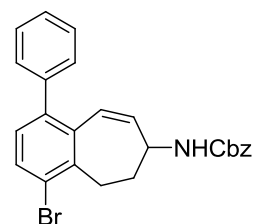
14 C₂₅H₂₂BrNO₃
464,35



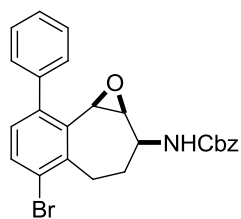
15a,b C₂₆H₂₅Br₂NO₃
559,29



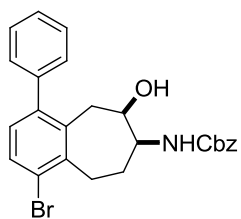
16 C₁₉H₁₇BrINO₂
498,15



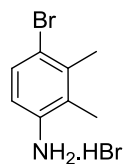
17 C₂₅H₂₂BrNO₂
448,35



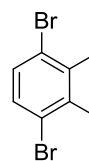
18 $C_{25}H_{22}BrNO_3$
464,35



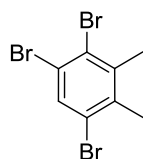
19 $C_{25}H_{24}BrNO_3$
466,37



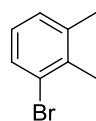
20 $C_8H_{11}Br_2N$
280,99



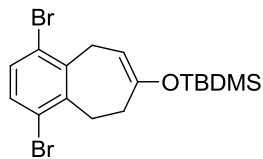
21 $C_8H_8Br_2$
263,96



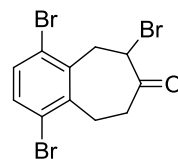
22 $C_8H_7Br_3$
342,85



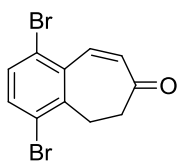
23 C_8H_9Br
185,06



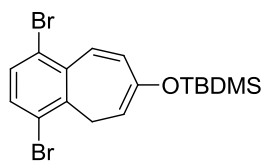
24 $C_{17}H_{24}Br_2OSi$
432,27



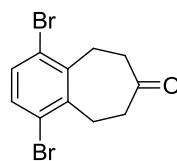
25 $C_{11}H_8Br_3O$
396,90



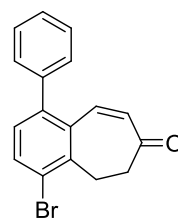
26 $C_{11}H_8Br_2O$
315,99



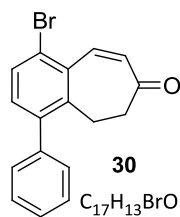
27 $C_{17}H_{22}Br_2OSi$
430,25



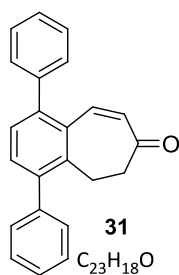
28 $C_{11}H_{10}Br_2O$
318,00



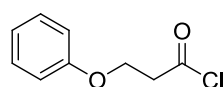
29 $C_{17}H_{13}BrO$
313,19



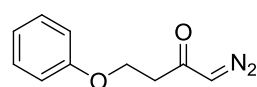
30 $C_{17}H_{13}BrO$
313,19



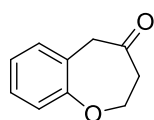
31 $C_{23}H_{18}O$
310,39



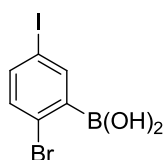
32 $C_9H_9ClO_2$
184,62



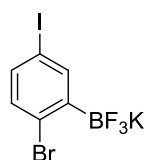
33 $C_{10}H_{10}N_2O_2$
190,20



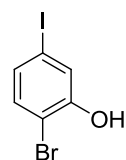
34 $C_{10}H_{10}O_2$
162,19



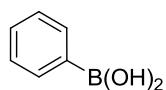
35 $C_6H_5BBrIO_2$
326,72



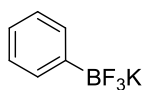
36 $C_6H_3BBrF_3IK$
388,80



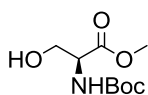
37 C_6H_4BrIO
298,90



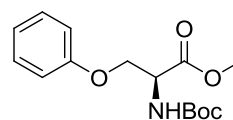
38 C₆H₇BO₂
121,93



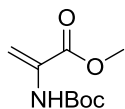
39 C₆H₅BF₃K
184,01



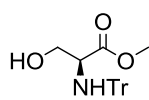
40 C₉H₁₇NO₅
219,23



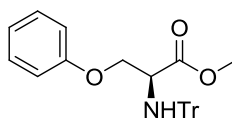
41 C₁₅H₂₁NO₅
295,33



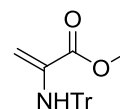
42 C₉H₁₅NO₄
201,22



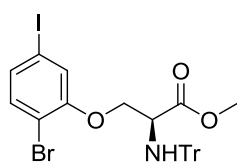
43 C₂₃H₂₃NO₃
361,10



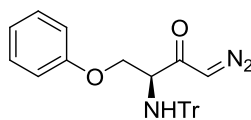
44 C₂₉H₂₇NO₃
435,10



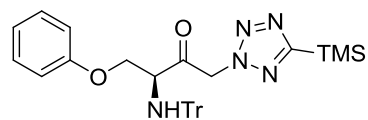
45 C₂₃H₂₁NO₂
345,10



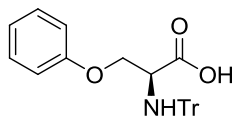
46 C₂₉H₂₅NBrIO₃
641,99



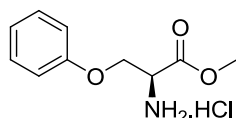
47 C₂₉H₂₅N₃O₂
447,53



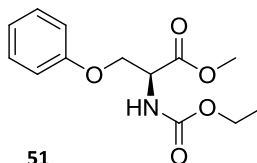
48 C₃₃H₃₅N₅O₂Si
561,75



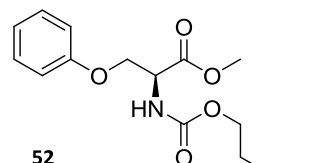
49 C₂₈H₂₅NO₃
423,51



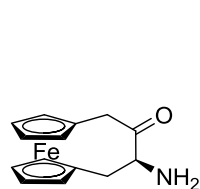
50 C₁₀H₁₄ClNO₃
231,68



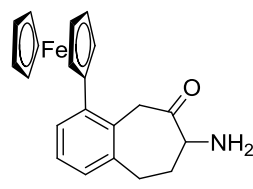
51 C₁₃H₁₇NO₅
267,28



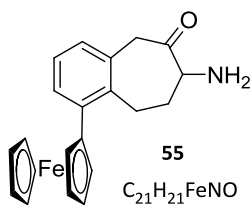
52 C₁₆H₂₅NO₅Si
339,46



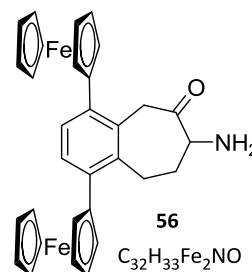
53 C₁₄H₁₅FeNO
269,12



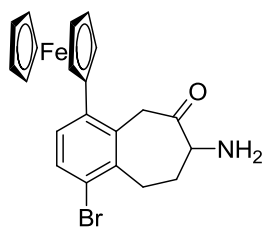
54 C₂₁H₂₁FeNO
359,24



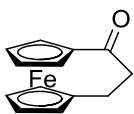
55 C₂₁H₂₁FeNO
359,24



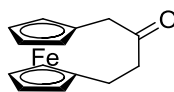
56 C₃₂H₃₃Fe₂NO
559,30



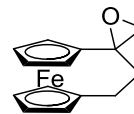
57 $C_{21}H_{20}BrFeNO$
438,14



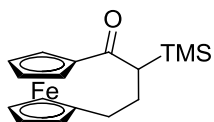
58 $C_{13}H_{12}FeO$
240,08



59 $C_{14}H_{14}FeO$
254,11



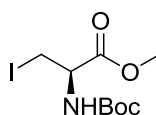
60 $C_{14}H_{14}FeO$
254,11



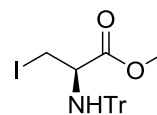
61 $C_{17}H_{22}FeOSi$
326,29



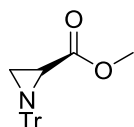
62 $C_{10}H_9FeI$
311,93



63 $C_9H_{16}INO_4$
329,13



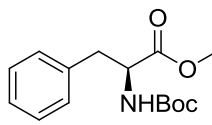
64 $C_{23}H_{24}NIO_2$
470,99



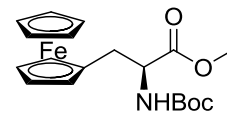
65 $C_{23}H_{22}NO_2$
343,09



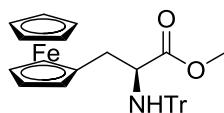
66 C_6H_5I
204,01



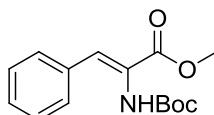
67a $C_{15}H_{21}NO_4$
279,33



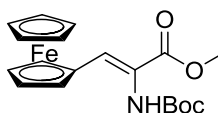
67b $C_{19}H_{25}FeNO_4$
387,25



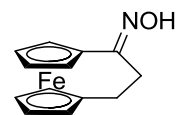
68 $C_{33}H_{31}NFeO_2$
529,11



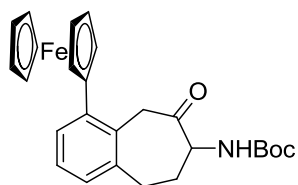
69a $C_{15}H_{19}NO_4$
277,32



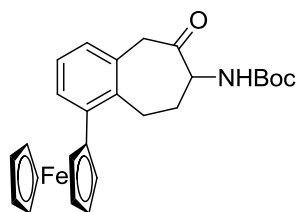
69b $C_{19}H_{21}FeNO_4$
383,24



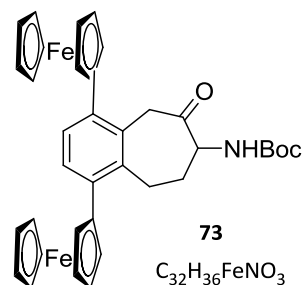
70 $C_{13}H_{13}FeNO$
255,09



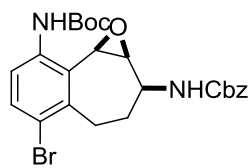
71 $C_{26}H_{29}FeNO_3$
459,36



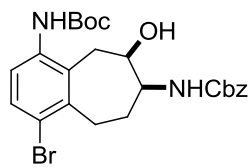
72
 $C_{26}H_{29}FeNO_3$
459,36



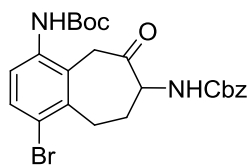
73
 $C_{32}H_{36}FeNO_3$
538,48



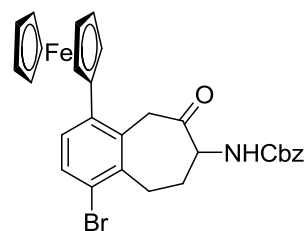
74 $C_{24}H_{27}BrN_2O_5$
503,39



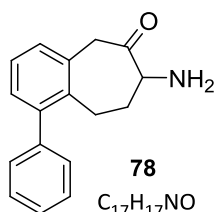
75 $C_{24}H_{29}BrN_2O_5$
505,40



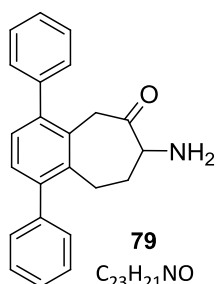
76 $C_{24}H_{27}BrN_2O_5$
503,39



77 $C_{29}H_{26}BrFeNO_3$
572,27



78 $C_{17}H_{17}NO$
251,32



79 $C_{23}H_{21}NO$
327,42

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Analyses HPLC

Les analyses des composés **1b.HCl**, **1b.TFA** et **54.TFA** ont été réalisées grâce à une HPLC en phase inverse. L'appareil utilisé est un Agilent 1100 series muni d'un détecteur à barrette de diodes et d'un injecteur automatique avec une boucle d'injection de 100 μ L. Les caractéristiques de la colonne et les conditions d'élutions sont décrites dans le Tableau 28.

Type de colonne et dimensions	Elution	Eluants	Débit et température	λ (nm)
Agilent Zorbax Sb-Aq C18 150 x 4,6 mm, 5 μ m	En mode gradient	de 5% de MeCN à 95% de MeCN en 6 min	1 mL/min 30°C	254 ^a
		co-solvant : H ₂ O + 0,1 % acide formique		275 ^b

^a longueur d'onde spécifique des composés phénylés **1a.HCl** et **1a.TFA**

^b longueur d'onde spécifique du composé ferrocénylé **54.TFA**

Tableau 28 : Caractéristiques de la colonne et conditions d'élutions pour analyser les composés **1b.HCl, **1b.TFA** et **54.TFA**.**

Les produits ont été dissous dans du tampon PBS isotonique pH 7,4 puis centrifugés durant 10 minutes à 10 000 rpm avant d'être filtré pour analyse (Figure 63). Les produits ont été analysés à différents temps : t = 0 et t = 24 h.

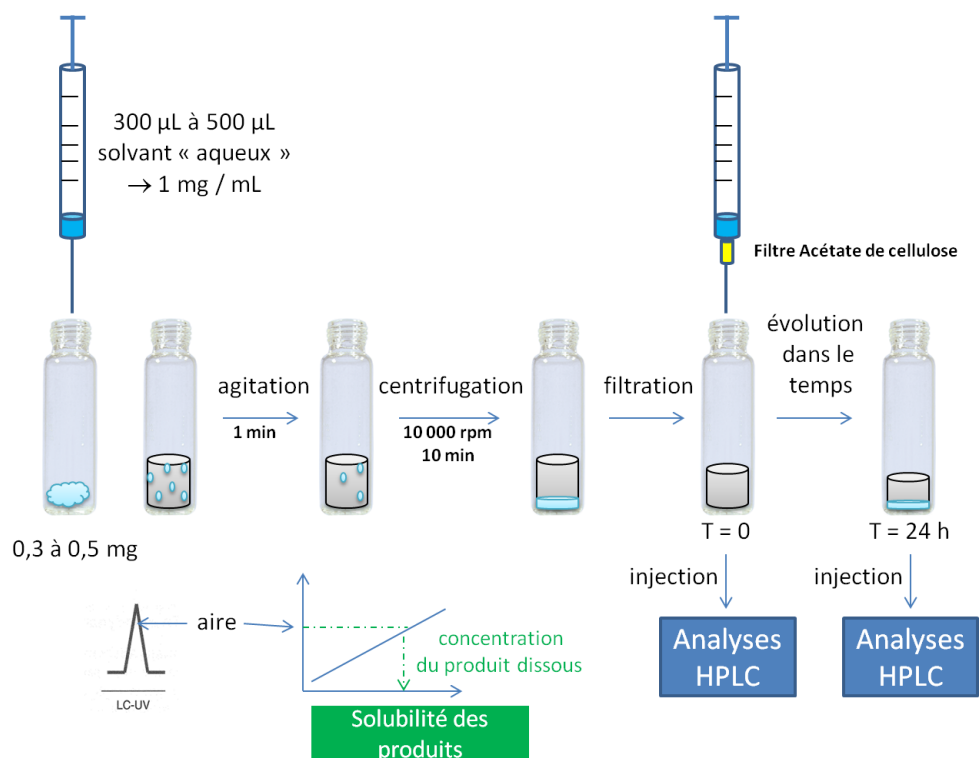


Figure 63 : Schéma de préparation des échantillons avant injection et interprétation des chromatogrammes obtenus.

Les courbes d'étalonnage obtenues pour les 3 composés qui nous intéressent sont présentées (Figure 64).

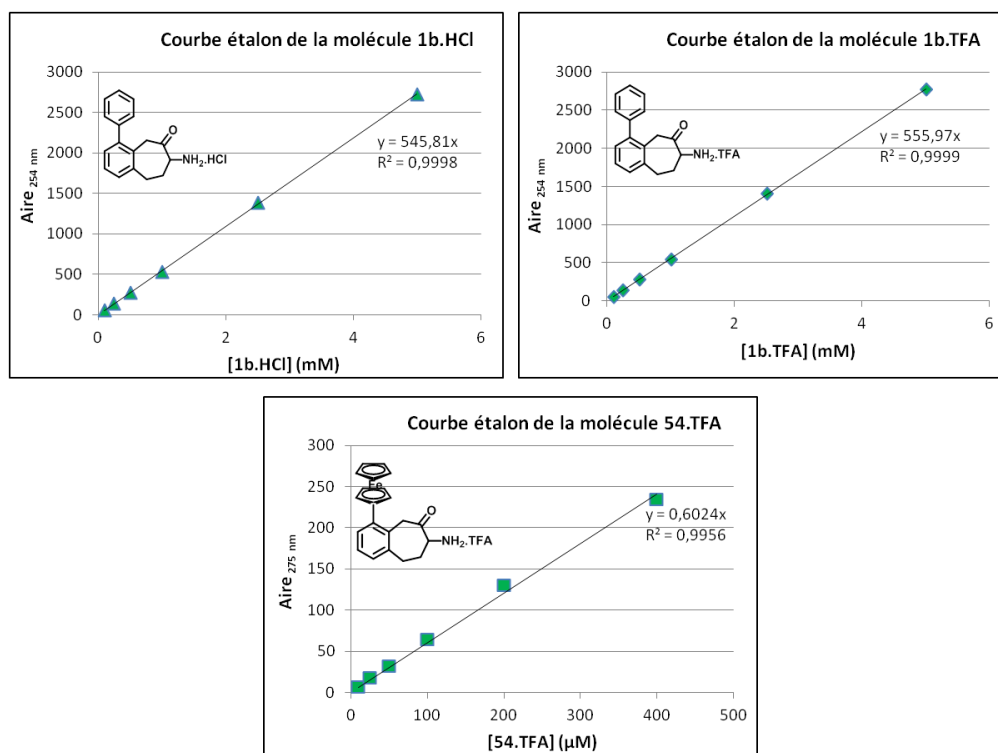
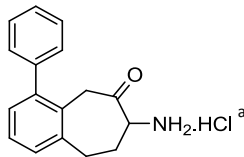
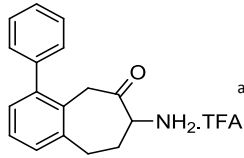
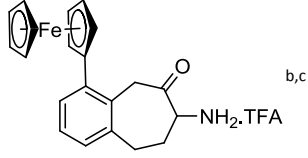


Figure 64 : Courbes d'étalonnage des dérivés 1b.HCl, 1b.TFA et 54.TFA.

Les résultats de solubilités obtenues à $t = 0$ et $t = 24$ h, à partir des chromatogrammes correspondants, sont réunis dans le Tableau 24.

Molécule (masse molaire)	Solubilité molaire (mM) Solubilité massique (mg/L) $t = 0$ h	Solubilité molaire (mM) Solubilité massique (mg/L) $t = 24$ h
 1b.HCl (287,78 g/mol)	$1,245 \pm 0,192$ 358 ± 55	$0,117 \pm 0,015$ 34 ± 04
 1b.TFA (365,35 g/mol)	$1,065 \pm 0,120$ 389 ± 44	$0,147 \pm 0,033$ 54 ± 12
 54.TFA (473,29 g/mol)	$0,262 \pm 0,020$ 124 ± 10	$0,046 \pm 0,006$ 22 ± 03

^a solution saturée réalisée dans une solution tampon phosphate PBS à 0,15 M, pH = 7,4 et 0,25 % de DMSO - longueur d'onde de détection $\lambda = 254$ nm

^b solution saturée réalisée dans une solution tampon phosphate PBS à 0,15 M, pH = 7,4 et 0,5 % de MeOH - longueur d'onde de détection $\lambda = 275$ nm

^c la solubilité du dérivé **54.HCl** n'a pu être déterminée car les quantités disponibles n'étaient plus suffisantes

Tableau 24 : Solubilité molaire (et massique) à T = 0 h et 24 h des dérivés phénylés et ferrocényles déterminés par HPLC

II. Tests enzymatiques

En ce qui concerne les tests enzymatiques, le substrat utilisé est la para-nitroanilide de leucine. La réaction d'hydrolyse de cette dernière par l'APN illustrée en Schéma 72, conduit à la p-nitroaniline, solution jaune, absorbant à 405 nm à pH = 7.5 ($\epsilon = 10800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

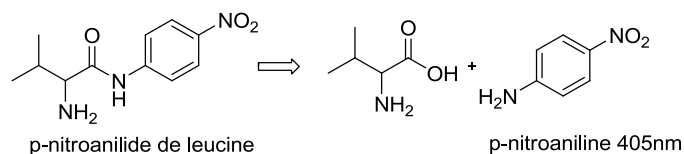


Schéma 72 : Réaction d'hydrolyse de la p-nitroanilide de leucine par une aminopeptidase

Nous avons ainsi suivi en fonction du temps la densité optique à 405 nm. La loi de Beer-Lambert $D_o = \epsilon lc$ s'applique et nous permet de déterminer des concentrations de produits formés et de mesurer des vitesses initiales (V_0). Toutes les inhibitions étant de type compétitif, les valeurs de l' IC_{50} et de constante d'inhibition K_i sont déterminées par la représentation de Dixon ($1/V_0 = f(I)$).

III. Synthèses

A. Généralités

Les différentes techniques employées pour la purification et l'analyse des composés synthétisés sont les suivantes :

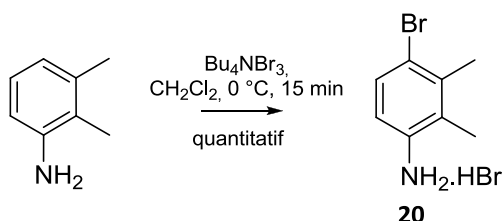
- Chromatographie Flash (chromatographie sur colonne) : Gel de silice (Merck 60, granulométrie 230-400)
- Chromatographie sur couche mince : silice sur plaque d'aluminium (Merck 60, F₂₅₄)
- Point de fusion : Banc Kofler, corrigé
- Spectres Infrarouge : Nicolet 405 FT-IR
- Les spectres RMN ¹H ont été enregistrés à 400 MHz sur un spectromètre Bruker Avance 400. Les déplacements chimiques (δ) sont indiqués en ppm relativement au signal du solvant (CDCl₃ : δ = 7.27 ppm, CD₃OD : δ = 3.31 ppm). Les constantes de couplages (*J*) sont données en Hertz. Les abréviations suivantes sont utilisées : s, singulet ; d, doublet ; t, triplet ; q, quadruplet ; m, multiplet ; l, signal large.
- Les spectres RMN ¹³C ont été enregistrés à 100 MHz sur un spectromètre Bruker Avance 400. Les déplacements chimiques (δ) sont indiqués en ppm relativement au signal du solvant (CDCl₃ : δ = 77.1 ppm, CD₃OD : δ = 49.0 ppm).
- Spectrométrie de Masse Haute Résolution : Bruker MicroTof, Institut de Chimie, UMR 7177 CNRS, ULP, Strasbourg, France, ou Agilent Technologies 6510 (QTof), ENSCMu, Université de Haute Alsace, Mulhouse, France
- Microanalyses : réalisées par le Service Central de Microanalyses du CNRS, F-69390 Vernaison ou Service de Microanalyse, UMR 7565 CNRS Université de Lorraine (ex Université Henri Poincaré) F-54506 Vandoeuvre-les-Nancy

B. Réactifs et Solvants

Le Pd/C (5%) a été obtenu chez Fluka. Le periodinane de Dess-Martin (DMP) a été préparé selon la méthode de la littérature (Ref. 73). Les solvants usuels ont été redistillés : EtOH et MeOH sur Mg/MgI₂, THF sur Na/benzophénone, Et₂O et toluène sur Na, CH₂Cl₂ sur P₂O₅ et conservé sur Na₂CO₃. NEt₃ a été distillée avant utilisation.

C. Modes opératoires et analyses

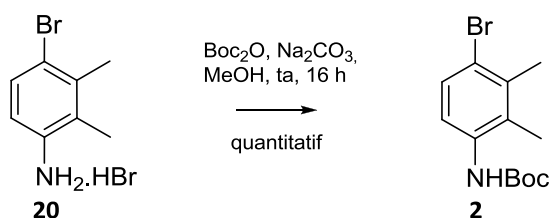
1. Bromhydrate de la 4-bromo-2,3-diméthylaniline (**20**)



À une solution de 2,3-diméthylaniline (2,5 mL, 20.1 mmol) dans du dichlorométhane anhydre (50 mL) est ajouté le tribromure de tétra-*n*butylammonium (10,18 g, 20,1 mmol, 1 éq.) à 0°C et sous Ar, puis le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 15 minutes. Le précipité formé est filtré sur fritté, lavé à l'éther diéthylique et séché sous vide pour donner **20** (5,6 g, quant.) sous forme d'une poudre blanche.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : $\delta=2,36$ (s, 3H, CH_3), 2,47 (s, 3H, CH_3), 7,11 (d, 1H, 3-H, $J = 8,3$ Hz), 7,58 (d, 1H, 2-H, $J = 8,6$ Hz)

2. 4-Bromo-N-*tert*-butoxycarbonyl-2,3-diméthylaniline (**2**)



Une solution de **20** (4 g, 14,2 mmol) et de Boc_2O (3,77 g, 17,3 mmol, 1,2 éq.) dans MeOH (40 mL) est agitée à ta en présence de Na_2CO_3 pulvérisé (3,35 g, 31,3 mmol, 2,2 éq.) pendant 1,5 h. Le milieu est évaporé puis le résidu est dissous dans AcOEt. La solution est alors lavée à l'eau, séchée (MgSO_4) et concentrée pour donner **2** (4,3 g, quant.) sous forme de cristaux incolores.

Pf : $117 - 118^\circ\text{C}$

IR (KBr) : $\nu=3365, 2988, 1695, 1509, 1280, 1244, 1160, 1020\text{ cm}^{-1}$

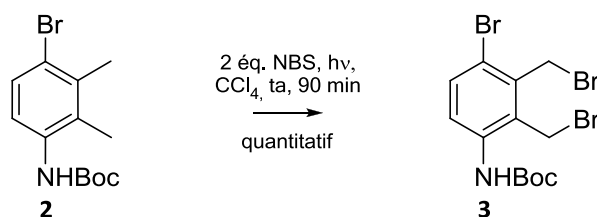
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : $\delta=1,51$ (s, 9H, CMe_3), 2,22 (s, 3H, 2-Me), 2,40 (s, 3H, 3-Me), 6,20 (s, 1H, NH), 7,38 (m, 2H, 5-H, 6-H)

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : $\delta=15,1$ (2-Me), 20,5 (3-Me), 28,5 (CMe_3), 80,7 (CMe_3), 121,0 (C-4), 121,8 (C-6), 129,7 (C-1), 130,1 (C-5), 135,4, 136,5 (C-3, C-2), 153,4 (NCO)

Anal. calc. pour $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{BrNO}_2$ (300,19) : C 52,01, H 6,04, N 4,67; trouvé : C 52,5, H 6,19, N 4,7

HRMS (ESI) : calc. pour $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{BrNNaO}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 322,0413 et 324,0394; trouvé : 322,0400 et 324,0396

3. 4-Bromo-N-*tert*-butoxycarbonyl-2,3-bis(bromométhyl)aniline (**3**)



Une solution de **2** (4 g, 13,3 mmol) et de *N*-bromosuccinimide finement pulv\u00e9ris\u00e9 (5 g, 27,9 mmol, 2,1 \u00e9q.) dans CCl_4 (160 mL) est agit\u00e9e, sous irradiation par une lampe \u00e0 mercure HPK125, pendant 1 \u00e0 2 h. Le milieu r\u00e9actionnel est lav\u00e9 \u00e0 l'eau, la phase aqueuse est extraite au CH_2Cl_2 , puis les phases organiques sont rassembl\u00e9es, s\u00e9ch\u00e9es (MgSO_4) et concentr\u00e9es pour donner **3** (6,1 g, quant.), apr\u00e8s recristallisation dans le cyclohexane, sous forme d'un solide cr\u00eame.

Pf : 116 – 117 $^\circ\text{C}$

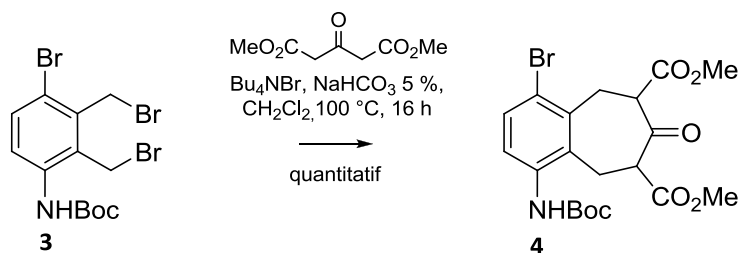
IR (KBr) : $\nu=547$, 829, 1066, 1158, 1206, 1219, 1240, 1365, 1408, 1471, 1497, 1716, 2981, 3412 cm^{-1}

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : $\delta=1,54$ (s, 9H, CMe_3), 4,65 (s, 2H, 2- CH_2Br), 4,73 (s, 2H, 3- CH_2Br), 6,54 (s, 1H, NH), 7,54 (d, 1H, 5-H), 7,71 (d, 1H, 6-H), $J_{5,6}=8,8$ Hz

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : $\delta=28,2$ (CMe_3), 29,6 (3- CH_2Br), 81,6 (CMe_3), 120,5 (C-4), 125,0 (C-6), 128,8 (C-1), 134,0 (C-5), 135,8, 137,2 (C-2, C-3), 152,6 (CO)

Anal. calc. pour $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{Br}_3\text{NO}_2$ (457,99) : C 34,00, H 3,52, N 3,06; trouv\u00e9 : C 34,2, H 3,5, N 2,9

4. Ester diméthylique du 4-bromo-1-*tert*-butoxycarbonylamino-7-oxo-5,6,8,9-tetrahydrobenzocycloheptan-6,8-dicarboxylate (**4**)



Une solution, sous vive agitation, de **3** (6,1 g, 13,3 mmol), d'acétate de carboxylate de méthyle (2,3 mL, 16 mmol, 1,2 éq.), de NBu₄Br (2,58 g, 8 mmol, 0,6 éq.) et de NaHCO₃ (solution à 5% dans l'eau, 50 mL) dans le CH₂Cl₂ (50 mL) est chauffée à 40 °C sous argon pendant 6 à 16 h. La phase organique est séparée, évaporée et le résidu est dissous dans AcOEt (200 mL). La phase aqueuse est extraite par AcOEt (2 × 50 mL), les phases organiques sont rassemblées, lavées par une solution de NaCl saturée (2 × 50 mL), séchées (MgSO₄) et concentrées pour donner **4** (6,3 g, quant., mélange d'isomères *cis/trans* 50:50) sous forme d'une résine incolore qui sera utilisée sans purification supplémentaire. L'isomère *trans* a pu être isolé par cristallisation dans *i*Pr₂O et caractérisé.

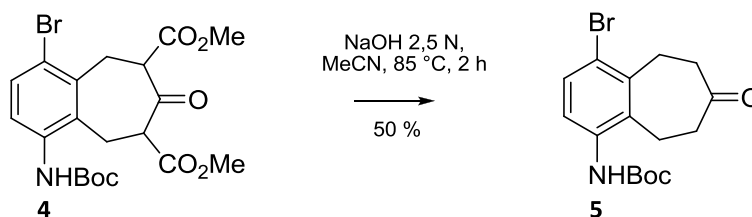
Pf : 175 – 177 °C

IR (KBr) : ν = 1167, 1202, 1239, 1281, 1365, 1515, 1693, 1737, 1754, 2950, 3343 cm⁻¹

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ = 1,52 (s, 9H, CMe₃), 3,19 (dd, 1H, 9-Heq), 3,33 (dd, 1H, 5-Hax), 3,44 (dd, 1H, 9-Heq), 3,63 (dd, 1H, 6-H), 3,74 (dd, 1H, 5-Heq), 3,75, 3,82 (2s, 2 × 3H, 2 × OMe), 4,25 (dd, 1H, 8-H), 7,46 (s, 2H, ArH), 7,71 (sl, 1H, NH), $J_{5ax,5eq}$ = 14,5, $J_{5ax,6}$ = 11,3, $J_{5eq,6}$ = 5,1, $J_{8,9ax}$ = 3,4, $J_{8,9eq}$ = 6,6, $J_{9eq,9ax}$ = 15,6 Hz

HRMS (ESI) : calc. pour C₂₀H₂₄BrNNaO₇ [M+Na]⁺ : 492.0628 et 494.0611; trouvé : 492.0625 et 494.0610

5. 4-Bromo-1-*tert*-butoxycarbonylamino-5,6,8,9-tetrahydrobenzocycloheptan-7-one
(**5**)



Une solution biphasique, sous vive agitation, de NaOH aqueux 2,5 N (50 mL) et de **4** (6,3 g, 13,3 mmol) dans MeCN (25 mL) est portée au reflux (85 °C) pendant 2 h. Le milieu est ramené à ta, neutralisé par addition progressive de NaHCO₃, puis extrait par AcOEt (2 × 40 mL). La phase organique est lavée par une solution de NaCl saturée (2 × 40 mL), séchée (MgSO₄) et concentrée pour donner **5** (2,35 g, 50 %) sous forme de cristaux incolores après purification par chromatographie sur colonne (cyclohexane/AcOEt 8:2) et lavage à *i*Pr₂O.

Pf : 135 – 136 °C

IR (KBr) : ν =3342, 2978, 2920, 1693, 1514, 1288, 1250, 1161, 1070, 903 cm⁻¹

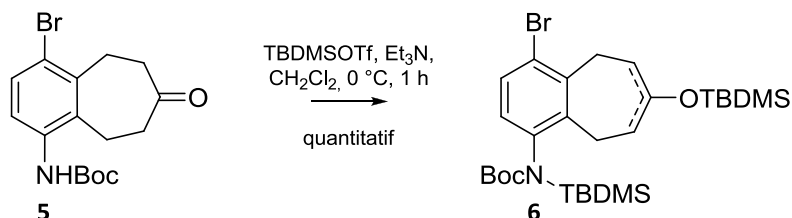
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ =1,50 (s, 9H, CMe₃), 2,62 (m, 4H, 6-CH₂, 8-CH₂), 2,95 (m, 2H, 9-CH₂), 3,22 (m, 2H, 5-CH₂), 6,19 (sl, 1H, NH), 7,24 (dl, 1H, 2-H), 7,48 (d, 1H, 3-H), $J_{2,3}$ =8,6 Hz

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ =24,1 (C-9), 28,4 (CMe₃), 29,0 (C-5), 43,5, 43,1 (C-6, C-8), 81,0 (CMe₃), 121,2 (C-4), 125,4 (C-2), 131,3 (C-3), 134,4 (C-9a), 137,2 (C-1), 140,8 (C-4a), 154,0 (NCO), 210,2 (CO-7)

Anal. calc. pour C₁₆H₂₀BrNO₃ (354,24) : C 54,24, H 5,69, N 3,95; trouvé : C 54,3, H 5,7, N 4,1

HRMS (ESI) : calc. pour C₁₆H₂₀BrNNaO₃ [M+Na]⁺ : 316,0524 et 378,0504; trouvé : 376,0517 et 378,0500

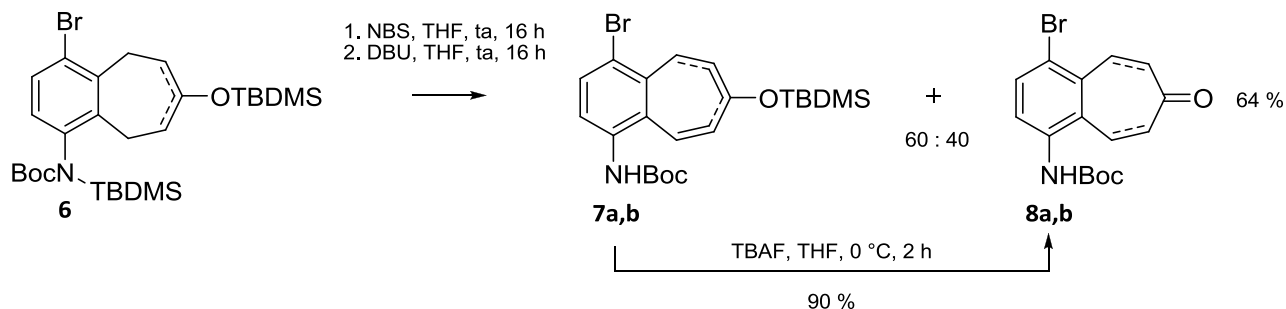
6. 1-Bromo-4-[(*tert*-butoxycarbonyl)-*tert*-butyldiméthylsilyl]amino-7-*tert*-butyldiméthylsilyloxy-6,9-dihydro-5H-benzocycloheptène et 4-bromo-1-[(*tert*-butoxycarbonyl)-*tert*-butyldiméthylsilyl]amino-7-*tert*-butyldiméthylsilyloxy-5,9-dihydro-5H-benzocycloheptène (mélange d'isomères 75:25, **6**)



À une solution de **5** (2 g, 5,6 mmol, séché par évaporation en présence de toluène) et de NEt_3 (1,9 mL, 13,5 mmol, 2,4 éq.) dans le CH_2Cl_2 sec (50 mL) est ajouté goutte-à-goutte du $\text{Me}_2^t\text{BuSiOTf}$ (2,85 mL, 12,4 mmol, 2,2 éq.) à 0 °C sous Argon. La solution est placée sous vive agitation à 0°C pendant 1 h. Le milieu est hydrolysé par une solution aqueuse de NaHCO_3 1N (20 mL) puis extrait par AcOEt (3 × 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées (MgSO_4) et concentrées pour donner **6** (3,8 g, quant.) sous forme d'une résine incolore qui sera utilisée sans purification supplémentaire.

RMN ^1H (isomères M et m 75:25, 400 MHz, CDCl_3) : δ = -0,30 (s, 3H, NSiMe), 0,07, 0,08 (2s, 6H, OSiMe $_2$), 0,39 (s, 3H, NSiMe), 0,87 (s, 9H, OSi t Bu), 1,05 (s, 9H, NSi t Bu), 1,43 (s, 9H, CO $_2^t$ Bu), 2,26, 2,36 (2 m, 2H, 6-CH $_2$), 2,90, 3,13, 3,25 (3 m, 2,5H, 5-CH $_2$ M+m, CH $_2$ -9 m), 3,54 (d, 1,5H, 9-CH $_2$ M, J = 6,5 Hz), 4,94 (dd, 0,25H, 8-H m, J = 7,3, 5,3 Hz), 5,07 (t, 0,75H, 8-H M, J = 6,5 Hz), 6,80 (d, 0,25H, 2-H m, J = 8,3 Hz), 6,81 (d, 0,75H, 3-H M, J = 8,6 Hz), 7,35 (d, 0,75H, 2-H M, J = 8,6 Hz), 7,35 (d, 0,25H, 3-H m, J = 8,3 Hz)

7. 1-Bromo-4-*tert*-butoxycarbonylamino-5,6-dihydrobenzocycloheptène-7-one (**8a**) et 4-bromo-1-*tert*-butoxycarbonylamino-5,6-dihydrobenzocycloheptène-7-one (**8b**), (mélange de régioisomères 75:25)



À une solution de **6** (2 g, 5,6 mmol), sous agitation, dans le THF sec (30 ml) à 0 °C sous Ar est ajouté par portions du NBS (2 g, 11,2 mmol, 2 éq.), puis l'agitation est maintenue pendant 16 h à ta. Une solution aqueuse de NaHCO₃ 1N (10 mL) est alors ajoutée puis le milieu est extrait par AcOEt (3 × 10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées à l'eau, séchées (MgSO₄) et concentrées pour donner un mélange des régioisomères de la bromocétone correspondante (quant.). Ce mélange est alors repris dans le THF (30 mL) puis additionné de DBU (1,8 mL, 11,8 mmol, 2,1 éq.). La solution obtenue est agitée pendant 16 h à ta. Après dilution par AcOEt (20 mL), la phase organique est lavée par une solution de NaCl saturée (20 mL), séchée (MgSO₄) et concentrée pour donner l'énone **8** ainsi qu'un mélange d'éthers d'énol silylés **7a** et **7b** (mélange **7a+7b/8** 60:40) qui ont pu être caractérisés après séparation par filtration sur colonne (cyclohexane/AcOEt 8:2). L'ensemble de ces composés est solubilisé dans le THF sec (10 mL) puis une solution de TBAF (2,2 g, 8,4 mmol, 1,5 éq.) dans le THF (5 mL) est ajoutée à 0°C sous Ar. Le milieu réactionnel est agité pendant 2 h puis la réaction est stoppée par addition d'une solution aqueuse saturée de NH₄Cl (20 mL). La phase organique est isolée, la phase aqueuse est extraite par AcOEt (2 × 20 mL) et les phases organiques rassemblées sont lavées par une solution de NaCl saturée (20 mL), séchées (MgSO₄) et concentrées pour donner **8a** et **8b** (1,28 g, 65 %, mélange 75:25) sous forme d'une résine incolore après purification par chromatographie sur colonne (cyclohexane/AcOEt 8:2).

Ether d'énol silylé **7a** :

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ=0,07 (s, 6H, OSiMe₂), 0,88 (s, 9H, OSi^tBu), 1,52 (s, 9H, CO₂^tBu), 2,83 (d, 1H, 5-H, J_{5,6}=7,4 Hz), 5,09 (dt, 1H, 6-H, J_{6,8}=1,5 Hz, J_{5,6}=7,4 Hz), 6,37 (s, 1 H, NH), 6,40 (dd, 1H, 8-H, J_{6,8} =1,5 Hz, J_{8,9}=12,1 Hz), 7,29 (d, 1H, 9-H, J_{8,9}=12,1 Hz), 7,40 (d, 1H, 2-Har, J_{2,3}=8,6 Hz), 7,49 (d, 1H, 3-Har)

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ =4,6 (OSiMe_2), 18,0 (SiCMe_3), 25,3 (C-5), 25,56 (SiCMe_3), 28,3 (CMe_3), 80,7 (CMe_3), 106,2 (C-6), 125,1 (C-2), 129,6 (C-8), 129,8 (C-3), 132,8 (C-9), 134,7, 140,0, 149,9 (C-7), 153,5 (CO_2^tBu)

Ether d'énol silylé **7b** :

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ =0,10 (s, 6H, OSiMe_2), 0,90 (s, 9H, SiCMe_3), 1,52 (s, 9H, CO_2^tBu), 3,09 (d, 1H, 5-H, $J_{8,9}$ =7,4 Hz), 5,11 (dt, 1H, 6-H, $J_{6,8}$ =1,5 Hz, $J_{5,6}$ =7,4 Hz), 6,34 (s, 1H, NH), 6,44 (dd, 1H, 8-H, $J_{6,8}$ =1,5 Hz, $J_{8,9}$ =11,8 Hz), 7,00 (d, 1H, 9-H, $J_{5,6}$ =12,1 Hz), 7,50 (d, 1H, 3-Har, $J_{2,3}$ =8,8 Hz), 7,57 (d, 1H, 2-Har)

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ =4,6 (OSiMe_2), 18,0 (SiCMe_3), 25,6 (SiCMe_3), 28,3 (CMe_3), 30,4 (C-9), 80,9 (CMe_3), 106,9 (C-8), 120,2 (C-2), 126,7 (C-5), 131,2 (C-6), 132,3, 132,8 (C-3), 134,3, 149,5 (C-7), 152,7 (CO_2^tBu)

Enone **8a** (majoritaire) :

IR (KBr) : ν =3343, 2985, 2955, 1693, 1655, 1521, 1253, 1163 cm^{-1}

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ =1,52 (s, 9H, CMe_3), 2,75 (m, 2H, 6- CH_2), 2,99 (m, 2H, 5- CH_2), 6,24 (s, 1H, NH), 6,29 (d, 1H, 8-H), 7,38 (d, 1H, 3-H), 7,50 (d, 1H, 9-H), 7,55 (d, 1H, 2-H), $J_{2,3}$ =8,6, $J_{8,9}$ =12,8 Hz

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ =23,2 (C-5), 28,2 (CMe_3), 43,2 (C-6), 81,0 (CMe_3), 123,2 (C-1), 127,8 (C-3), 130,2 (C-8), 131,5 (C-2), 134,3, 134,9 (C-4a, C-9a), 138,1 (C-4), 140,0 (C-9), 153,7 (NCO_2), 201,5 (C-7)

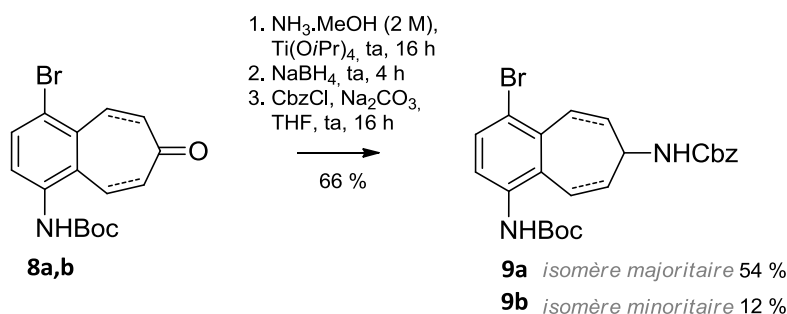
HRMS (ESI) : calc. pour $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{BrNNaO}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 374.0362; trouvé : 374,0353

Enone **8b** (minoritaire) :

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ =1,54 (s, 9H, CMe_3), 2,73 (m, 2H, CH_2 -6), 3,27 (m, 2H, CH_2 -5), 6,24 (s, 1H, NH), 6,31 (d, 1H, 8-H), 7,16 (d, 1H, 9-H), 7,58 (m, 2H, 2-H, 3-H), $J_{8,9}$ =12,8 Hz

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ =28,2 (CMe_3), 28,5 (C-5), 43,3 (C-6), 81,4 (CMe_3), 118,9 (C-4), 122,9 (C-2), 130,8 (C-8), 133,9 (C-3), 134,1 (C-9), 136,8, ca, 138, 141,2 (C-1, C-4a, C-9a), 152,7 (NCO_2), 201,9 (C-7)

8. 1-Bromo-4-*tert*-butoxycarbonylamino-7-benzyloxycarbonylamino-6,7-dihydro-5H-benzocycloheptène (**9a**) and 4-bromo-1-*tert*-butoxycarbonylamino-7-benzyloxycarbonylamino-6,7-dihydro-5H-benzocycloheptène (**9b**)



Une solution de **8a** et de son régioisomère **8b** (1,28 g, 3,6 mmol) dans NH_3 2,8 M dans MeOH (20 mL) en présence de $\text{Ti}(\text{O}i\text{Pr})_4$ (2,06 g, 7,2 mmol, 2 éq.) est agitée à ta sous Ar pendant 16 h. NaBH_4 (137 mg, 3,6 mmol, 1 éq.) est alors ajouté par portion et l'agitation est maintenue pendant 4 h supplémentaires. Le milieu est évaporé et le résidu est placé sous vive agitation dans un mélange d'AcOEt (50 mL) et d'une solution aqueuse de NH_4OH 1N (50 mL) pendant 2 h. Les sels de titane sont filtrés et lavés par un mélange identique de solvants, les phases organiques sont séparées et les phases aqueuses sont extraites par AcOEt (50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées (MgSO_4) et concentrées pour donner un mélange isomérique d'amines (7,9 g, 90 %, 80:20). Ce mélange est repris dans le THF (12 mL), additionné de Na_2CO_3 (0,77 g, 7,2 mmol, 2 éq.) et de ClCO_2Bn (0,57 mL, 4 mmol, 1,1 éq) puis agité à ta pendant 16 h. La solution est alors évaporée, le résidu est dissous dans AcOEt (15 mL) puis lavé à l'eau. La phase organique est séchée (MgSO_4) et concentrée pour donner un mélange brut (0,89 g), résolu par chromatographie sur colonne successives (cyclohexane/AcOEt 9:1) pour donner **9a** (947 mg, 54 %) et **9b** (210 mg, 12 %) sous forme de cristaux incolores.

Isomère **9a** (majoritaire) :

Pf : 164 °C

IR (KBr) : $\nu=3336, 2974, 2934, 1692, 1545, 1516, 1254, 1163, 1042, 776, 695 \text{ cm}^{-1}$

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : $\delta=1,51$ (s, 9H, CMe₃), 2,05 (dddd, 1H, 6-Hb), 2,39 (dddd, 1H, 6-Ha), 2,56 (ddd, 1H, 5-Hb), 2,77 (ddd, 1H, 5-Ha), 4,28 (dddd, 1H, 7-H), 4,80 (d, 1H, 7-NH), 5,11 (s, 2H, CH₂Ph), 6,03 (dd, 1H, 8-H), 6,14 (s, 1H, 4-NH), 6,75 (dd, 1H, 9-H), 7,34 (m, 5H, ArH), 7,32 (d, 1H, 3-H), 7,43 (d, 1H, 2-H). $J_{2,3}=8,6$, $J_{5a,5b}=14,3$, $J_{5a,6a}=3,6$, $J_{5a,6b}=5,2$, $J_{5b,6a}=11,3$, $J_{5b,6b}=4,4$, $J_{6a,6b}=13,2$, $J_{6a,7}=6,8$, $J_{6b,7}=8,4$, $J_{7,\text{NH}}=7,8$, $J_{7,8}=4,6$, $J_{7,9}=2,0$, $J_{8,9}=11,6 \text{ Hz}$

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ =24,8 (C-5), 28,3 (CMe_3), 38,1 (C-6), 50,2 (C-7), 66,8 (CH_2Ph), 80,8 (CMe_3), 120,5 (C-1), 124,6 (C-3), 128,1, 128,1, 128,5 (3 CHar), 129,5 (C-9), 130,6 (C-2), 133,8 (C-8), 134,1, 135,9, 136,2, 136,3 (C-4, C-4a, C-9a, Car-s), 153,6 (NCO_2^tBu), 155,4 (NCO_2Bn)

HRMS (ESI) : calc. pour $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{BrN}_2\text{NaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 509,1046 et 511,1025; trouvé : 509,1040 et 511,1026

Isomère **9b** (minoritaire) :

Pf : 192 °C

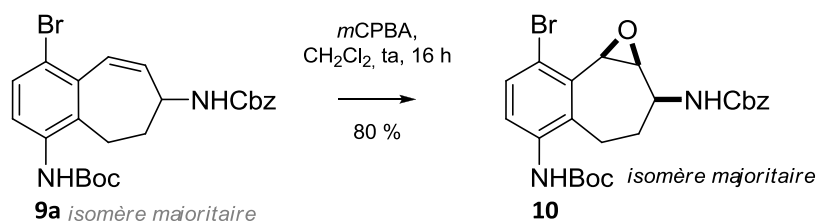
IR (KBr) : ν =2976, 2931, 1691, 1540, 1517, 1291, 1253, 1162, 1028, 779, 695 cm^{-1}

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ =1,51 (s, 9H, CMe_3), 1,97 (dddd, 1H, 6-Hb), 2,47 (dddd, 1H, 6-Ha), 2,57 (ddd, 1H, 5-Hb), 3,15 (ddd, 1H, 5-Ha), 4,10 (dddd, 1H, 7-H), 4,88 (d, 1H, 7-NH), 5,07 (s, 2H, CH_2Ph), 6,16 (dd, 1H, 8-H), 6,36 (sl, 1H, 1-NH), 6,46 (dd, 1H, 9-H), 7,34 (s, 5H, ArH), 7,44 (d, 1H, 3-H), 7,70 (d, 1H, 2-H), $J_{2,3}$ =8,8, $J_{5a,5b}$ =13,0, $J_{5a,6a}$ =4,7, $J_{5a,6b}$ =2,9, $J_{5b,6a}$ =13,0, $J_{5b,6b}$ =5,8, $J_{6a,6b}$ =12,4, $J_{6a,7}$ =7,0, $J_{6b,7}$ =10,6, $J_{7,8}$ =5,0, $J_{\text{NH},7}$ =8,0, $J_{7,9}$ =1,5, $J_{8,9}$ =10,8 Hz

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ =28,3 (CMe_3), 30,2 (C-5), 39,5 (C-6), 49,6 (C-7), 66,8 (CH_2Ph), 80,9 (CMe_3), 118,1 (C-4), 120,0 (C-2), 123,4 (C-9), 128,0, 128,2, 128,5 (3 CHar), 130,6 (C-1), 131,9 (C-3), 135,0, 136,4 (Car-s, C-9a), 137,7 (C-8), 139,4 (C-4a), 152,5 (NCO_2^tBu), 155,7 (NCO_2Bn)

HRMS (ESI) : calc. pour $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{BrN}_2\text{NaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 509,1046 et 511,1025; trouvé : 509,1047 et 511,1025

9. *cis*-4-Bromo-1-*tert*-butoxycarbonylamino-7-benzyloxycarbonylamino-5,6-époxy-6,7,8,9-tetrahydro-5H-benzocycloheptène (**10**)



Une solution de **9a** (900 mg, 1,8 mmol) et de *m*CPBA (510 mg, 2,95 mmol, 1,6 éq.) dans le CH_2Cl_2 (30 mL) est agitée à 0 °C sous Ar pendant 16 h. Une solution aqueuse de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,4

M dans NaHCO₃ 1N (30 mL) est alors ajoutée puis le mélange est agité à ta pendant 30 min supplémentaires. Après élimination des insolubles, le milieu est extrait par AcOEt (3 × 10 mL), les phases organiques sont lavées par une solution de NaHCO₃ 1N (2 × 10 mL) puis par une solution de NaCl saturée, séchées (MgSO₄) et concentrées pour donner **10** (743 mg, 80 %) sous forme de cristaux incolores après lavage par *i*Pr₂O.

Pf : 150 °C

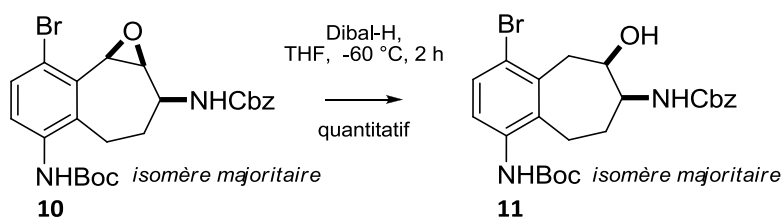
IR (KBr) : ν =3327, 2976, 2938, 1688, 1530, 1507, 1312, 1276, 1247, 1162, 1066, 1016 cm⁻¹

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, 323 K) : δ =1,51 (s, 9H, CMe₃), 1,59 (dddd, 1H, 8-Hb), 2,13 (dddd, 1H, 8-Ha), 2,49 (ddd, 1H, 9-Hb), 2,91 (ddd, 1H, 9-Ha), 3,69 (dt, 1H, 6-H), 4,26 (d, 1H, 5-H), 4,43 (dddd, 1H, 7-H), 4,81 (dl, 1H, 7-NH), 5,11 (s, 2H, CH₂Ph), 6,09 (sl, 1H, 1-NHBoc), 7,31 (d, 1H, 2-H), 7,33 (m, 5H, ArH), 7,47 (d, 1H, 3-H), $J_{2,3}$ =8,6, $J_{5,6}$ =4,0, $J_{6,7}$ =4,2, $^4J_{6,8a}$ =1,2, $J_{7,8a}$ =5,5, $J_{7,8b}$ =10,0, $J_{7,NH}$ =7,6, $J_{8a,8b}$ =13,9, $J_{8a,9a}$ =7,6, $J_{8a,9b}$ =2,3, $J_{8b,9a}$ =2,3, $J_{8b,9b}$ =10,2, $J_{9a,9b}$ =15,3 Hz

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ =22,9 (C-9), 27,3 (CMe₃), 29,3 (C-8), 49,7 (C-7), 57,8 (C-5), 58,3 (C-6), 65,7 (CH₂Ph), 80,0 (CMe₃), 124,2 (C-4), 125,9 (C-2), 126,9, 127,1, 127,5 (3 CHar), 130,2 (C-3), 131,8, 132,8, 135,4 (C-4a, C-9a, Car-s), 137,1 (C-1), 152,6 (NCO-1), 154,6 (NCO-7)

HRMS (ESI) : calc. pour C₂₄H₂₇BrN₂NaO₅ [M+Na]⁺ : 525,1001 et 527,0981; trouvé : 525,0990 et 527,0976

10. *cis*-4-Bromo-1-*tert*-Butoxycarbonylamino-7-benzyloxycarbonylamino-6,7,8,9-tetrahydro-5H-benzocycloheptène-6-ol (**11**)



À une solution de **10** (700 mg, 1,39 mmol) dans le THF (20 mL) à -78 °C est ajouté goutte-à-goutte du Dibal-H (1 M dans le toluène, 8,4 mL, 8,4 mmol, 6 éq.). La solution est alors agitée à -30°C pendant 1 h. Une solution aqueuse de tartrate de sodium 1 M (10 mL) et d'AcOEt (10 mL) sont alors ajoutés et le mélange est agité pendant 30 min. Les phases sont séparées, la phase aqueuse est extraite par AcOEt (10mL) et la phase organique est lavée par une solution de NaCl saturée. Les phases organiques sont rassemblées, séchées (MgSO₄) et

concentrées pour donner **11** (705 mg, quant.) sous forme d'un solide crème après lavage par Et₂O.

Pf : 166 °C

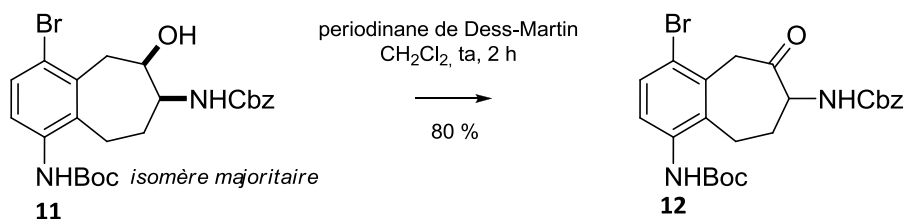
IR (KBr) : $\nu=3319, 2926, 1698, 1541, 1509, 1248, 1164, 1045 \text{ cm}^{-1}$

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, 323 K) : $\delta=1,51$ (s, 9H, CMe₃), 1,55 (dddd, 1H, 8-Hb), 2,03 (dddd, 1H, 8-Ha), 2,55 (ddd, 1H, 9-Hb), 3,00 (ddd, 1H, 9-Ha), 3,04 (dd, 1H, 5-Hb), 3,72 (dd, 1H, 5-Ha), 3,85 (dddd, 1H, 7-H), 4,20 (ddt, 1H, 6-H), 5,12 (s, 2H, CH₂Ph), 5,22 (dl, 1H, 7-NH), 6,10 (sl, 1H, 1-NH), 7,25 (d, 1H, 2-H), 7,36 (m, 5H, ArH), 7,44 (d, 1H, 3-H), $J_{2,3}=8,5$, $J_{5a,5b}=14,7$, $J_{5a,6}=8,2$, $J_{5b,6}=1,0$, $J_{6,7}=3,0$, $^4J_{6,8a}=1,0$, $J_{\text{NH},7}=8,5$, $J_{7,8a}=4,2$, $J_{7,8b}=11,5$, $J_{8a,8b}=13,5$, $J_{8a,9a}=8,4$, $J_{8a,9b}=1,4$, $J_{8b,9a}=1,6$, $J_{8b,9b}=10,9$, $J_{9a,9b}=15,1 \text{ Hz}$

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : $\delta=25,4$ (C-9), 27,6 (C-8), 28,3 (CMe₃), 37,5 (C-6), 56,8 (C-7), 66,7 (CH₂Ph), 68,4 (C-5), 80,8 (CMe₃), 123,6 (C-4), 125,6 (C-2), 128,0, 128,1, 128,5 (3 CHar), 130,9 (C-3), 133,8, 135,0, 136,4 (C-4a, C-9a, Car-s), 138,4 (C-1), 153,79 (NCO-1), 155,63 (NCO-7)

HRMS (ESI) : calc. pour C₂₄H₃₀BrN₂O₄ [M+H]⁺ : 505,1333 et 507,1312; trouvé : 505,1316 et 507,1307

11. 4-Bromo-1-*tert*-butoxycarbonylamino-7-benzyloxycarbonylamino-5,7,8,9-tetrahydrobenzocycloheptène-6-one (**12**)



À une solution de l'alcool **11** (700 mg, 1,4 mmol) dans le CH₂Cl₂ (20 mL) est ajouté du périodine de Dess-Martin (882 mg, 2,1 mmol, 1,5 éq.). Le mélange est alors agité pendant 2 h à ta puis dilué par CH₂Cl₂ et H₂O. Après séparation, la phase aqueuse est extraite par CH₂Cl₂. Les phases organiques sont rassemblées, séchées (MgSO₄) et concentrées pour donner **12** (560 mg, 80 %) sous forme de cristaux beiges après purification par chromatographie sur colonne (AcOEt / cyclohexane 8:2).

Pf : 174-176 °C

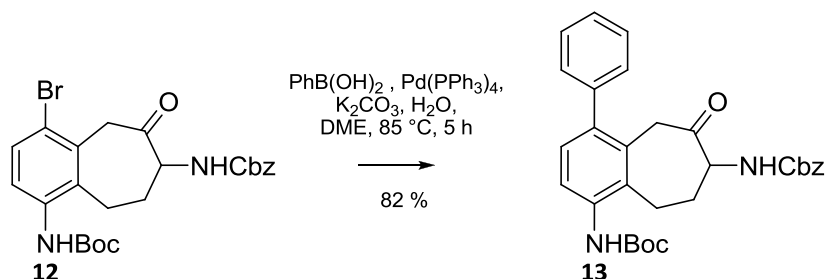
IR (KBr) : $\nu=3315, 2926, 1686, 1527, 1506, 1250, 1161, 995, 697 \text{ cm}^{-1}$

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , 323 K) : $\delta=1,51$ (s, 9H, CMe_3), 1,57 (m, 1H, 8-Hb), 2,66 (dddd, 1H, 8-Ha), 2,86 (ddd, 1H, 9-Hb), 2,96 (ddd, 1H, 9-Ha), 3,95 (d, 1H, 5-Hb), 4,24 (d, 1H, 5-Ha), 4,54 (ddd, 1H, 7-H), 5,07 (s, 2H, CH_2Ph), 5,69 (d, 1H, NHCbz), 6,22 (sl, 1H, NHBoc), 7,36 (m, 6H, 2-H + Cbz), 7,44 (d, 1H, 3-H) $J_{2,3}=8,6$, $J_{5a,5b}=17,4$, $J_{\text{NH},7}=6,5$, $J_{7,8a}=7,5$, $J_{7,8b}=10,6$, $J_{8a,8b}=12,5$, $J_{8a,9a}=5,2$, $J_{8a,9b}=11,6$, $J_{8b,9a}=5,2$, $J_{8b,9b}=4,7$, $J_{9a,9b}=15,5 \text{ Hz}$

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : $\delta=24,6$ (C-9), 28,2 (CMe_3), 32,4 (C-8), 47,0 (C-6), 59,1 (C-7), 66,7 (CH_2Ph), 81,0 (CMe_3), 125,5 (C-3), 128,0, 128,1, 128,5 (5C Cbz), 131,3 (C-2), 153,5, 155,3 (2 NCO_2), 204,2 (C-6), 121,1, 133,8, 134,6, 136,2, 138,4 (5 C^{IV})

HRMS (ESI) : calc. pour $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{BrN}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 503,1176 ; trouvé : 503,1170

12. 1-*tert*-Butoxycarbonylamino-4-phényl-7-benzyloxycarbonylamino-5,7,8,9-tetrahydro-benzocycloheptène-6-one (**13**)



Une solution de **12** (4 g, 7,9 mmol), PhB(OH)_2 (1,47 g, 11,9 mmol, 1,5 éq.), $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (937 mg, 0,8 mmol, 10 %mol) et K_2CO_3 (1,65 g, 11,9 mmol, 1,5 éq.) dans un mélange de DME (112 mL) et de H_2O (25 mL) est portée au reflux sous Ar pendant 5 h. De l'eau (100 mL) est ajouté puis la solution est extraite par AcOEt ($3 \times 100 \text{ mL}$), la phase organique est lavée par une solution de NaCl saturée (100 mL), séchée (MgSO_4) et concentrée pour donner **13** (3,25 g, 82 %) sous forme de cristaux bruns après purification par chromatographie sur colonne (AcOEt / cyclohexane 8:2).

Pf : 168°C

IR (KBr) : $\nu=3331, 2969, 2929, 1718, 1688, 1513, 1367, 1246, 1163, 1015, 756, 710, 696 \text{ cm}^{-1}$

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , 323 K) : $\delta=1,54$ (s, 9H, CMe_3), 1,60 (ddt, 1H, 8-Hb), 2,71 (ddt, 1H, 8-Ha), 3,00 (dd, 2H, CH_2 -9), 3,71 (d, 1H, 5-Hb), 3,81 (d, 1H, 5-Ha), 4,55 (ddd, 1H, 7-H), 5,07 (s,

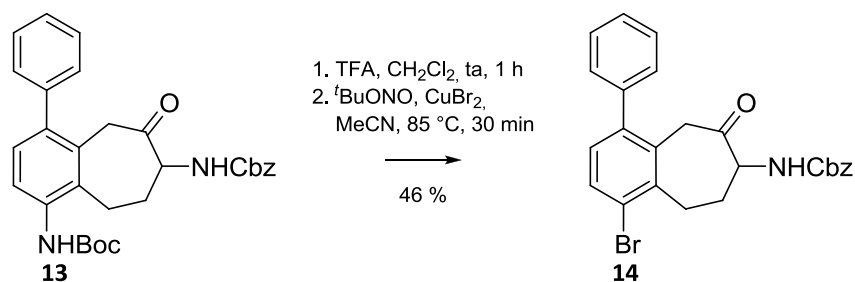
2H,CH₂Ph), 5,58 (dl, 1H, 7-NH), 6,20 (sl, 1H, 1-NHBoc), 7,18 (d, 1H, 3-H), 7,28-7,43 (m, 10H, ArH), 7,47 (d, 2-H), $J_{2,3}=8,2$, $J_{5a,5b}=16,0$, $J_{7,NH}=7,4$, $J_{7,8a}=7,0$, $J_{7,8b}=11,0$, $J_{8a,9}=7,3$, $J_{8b,9}=5,5$, $J_{8a,8b}=13,0$ Hz

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ =24,2 (C-9), 28,3 (CMe₃), 32,9 (C-8), 43,9 (C-5), 60,3 (C-7), 66,8 (CH₂Ph), 80,7 (CMe₃), 124,0 (C-2), 127,2, 128,0, 128,1, 128,3, 128,6, 129,8 (6 CHar), 129,3 (C-3), 131,0 (C-9a), 133,7 (C-1), 134,2, 136,2 (C-4, C-4a), 140,0, 140,5 (2 Car), 153,9 (NCO-1), 155,4 (NCO-7), 204,9 (CO-6)

HRMS (ESI) : calc. pour C₃₀H₃₂N₂NaO₅ [M+Na]⁺ : 523,2203; trouvé : 523,2206

calc. pour C₃₀H₃₃N₂O₅ [M+H]⁺ : 501,2389; trouvé : 501,2390

13. 1-Bromo-4-phényl-7-benzyloxycarbonylamino-5,7,8,9-tetrahydrobenzocycloheptène-6-one (**14**) : Méthode A



Une solution de **13** (3 g, 6 mmol) dans CH₂Cl₂ sec (110 mL) et CF₃CO₂H (110 mL) est agitée à ta sous Ar pendant 1 h. Une solution aqueuse de NaHCO₃ 1N (500 mL) est ajoutée, le milieu est extrait par CH₂Cl₂ (3 × 100 mL), les phases organiques sont lavées par une solution de NaCl saturée, séchées (MgSO₄) et concentrées. L'amine brute est reprise dans MeCN sec (110 mL) puis la solution est agitée sous Ar en présence de CuBr₂ (1,35 g, 6 mmol, 1 éq.) et de ^tBuONO (1,46 mL, 12,4 mmol, 2 éq.) pendant 16h à ta et 4 h au reflux. De l'eau (100 mL) est alors ajoutée, le milieu est extrait par AcOEt (3 × 100 mL), les phases organiques sont rassemblées, lavées par une solution de NaCl saturée, séchées (MgSO₄) et concentrées pour donner **14** (1,28 g, 46 %) sous forme d'un solide brun après purification par chromatographie sur colonne (AcOEt / cyclohexane 8:2).

Pf : 96 °C

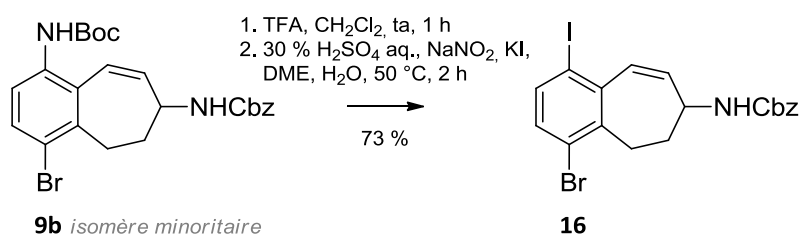
IR (KBr) : ν =3315, 2929, 1718, 1677, 1533, 1451, 1384, 1361, 1319, 1257, 1017, 1075, 990, 776, 742, 698 cm⁻¹

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , 323 K) : δ =1,57 (dddd, 1H, 8-Hb), 2,72 (dddd, 1H, 8-Ha), 3,22 (ddd, 1H, 9-Hb), 3,32 (ddd, 1H, 9-Ha), 3,72 (d, 1H, 5-Hb), 3,84 (d, 1H, 5-Ha), 4,53 (ddd, 1H, 7-H), 5,09 (s, 2H, CH_2Ph), 5,53 (dl, 1H, 7-NH), 7,06 (d, 1H, 3-H), 7,27e7,45 (m, 10H, ArH), 7,55 (d, 1H, 2-H), $J_{2,3}$ =8,2, $J_{5a,5b}$ =16,4, $J_{7,8a}$ =7,6, $J_{7,8b}$ =10,8, $J_{7,\text{NH}}$ =8,0, $J_{8a,8b}$ =12,8, $J_{8a,9a}$ =4,5, $J_{8a,9b}$ =10,6, $J_{8b,9a}$ =6,4, $J_{8b,9b}$ =4,3, $J_{9a,9b}$ =14,8 Hz

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ =29,7 (C-9), 32,4 (C-8), 44,5 (C-5), 59,6 (C-7), 66,9 (CH_2Ph), 123,6 (C-1), 127,6, 128,1, 128,2, 128,4, 128,5, 129,5 (6 CHar), 130,2 (C-3), 131,7 (C-2), 132,2 (C-4a), 136,2 (Car (Ph)), 139,1, 139,8, 142,1 (C-4, C-9a, Car-s(Bn)), 155,3 (NCO), 205,1 (CO-6)

HRMS (ESI) : calc. pour $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{BrNO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 464,0861 et 466,0841; trouvé : 464,0860 et 466,0838

14. 4-Bromo-1-iodo-7-benzyloxycarbonylamino-6,7-dihydro-5H-benzocycloheptène (**16**)



Une solution de **9b** (200 mg, 0,41 mmol) dans CH_2Cl_2 sec (5 mL) et $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ (5 mL) est agitée à 0 °C sous Ar pendant 45 min. Une solution aqueuse de NaHCO_3 1N (50 mL) est ajoutée, le milieu est extrait par CH_2Cl_2 (5 \times 10 mL), les phases organiques sont lavées par une solution de NaCl saturée, séchées (MgSO_4) et concentrées. Le résidu est solubilisé dans le DME (3 mL) et une solution aqueuse de H_2SO_4 30% v/v (3 mL) puis la solution est amenée à 0°C et une solution de NaNO_2 (106 mg, 1,54 mmol, 3,5 éq.) dans H_2O (2,5 mL) est ajoutée. Le mélange est agité à 0 °C pendant 1 h et une solution de KI (855 mg, 5,15 mmol, 1,25 éq.) dans H_2O (2,5 mL) est ajoutée, suivie d'une solution identique 1 h plus tard. Après 1 h d'agitation supplémentaire, H_2O (20 mL) est ajoutée et la solution est extraite par AcOEt (3 \times 20 mL), les phases organiques sont rassemblées, lavées par une solution de NaCl saturée (10 mL), séchées (MgSO_4) et concentrées pour donner **16** (149 mg, 73 %) sous forme de cristaux bruns après purification par chromatographie sur colonne (AcOEt / cyclohexane 9:1).

Pf : 158 °C

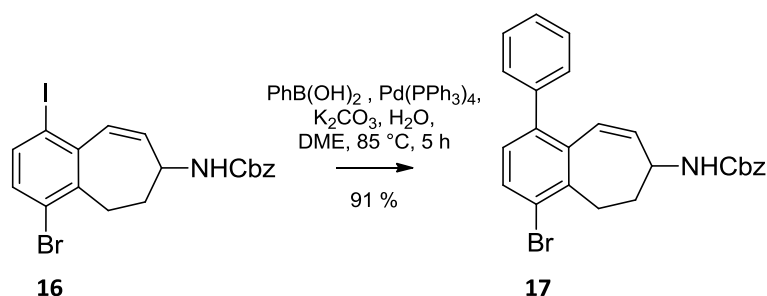
IR (KBr) : ν =3315, 2930, 1687, 1542, 1274, 1257, 1032 cm^{-1}

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ =2,00 (dddd,1H, 6-Hb), 2,48 (dddd,1H, 6-Ha), 2,65 (ddd,1H, 5-Hb), 3,17 (ddd,1H, 5-Ha), 4,13 (dddd,1H, 7-H), 4,90 (d,1H, 7-NH), 5,08 (s, 2H, CH_2Ph), 6,02 (dd, 1H, 8-H), 6,54 (dd, 1H, 9-H), 7,15 (d, 1H, 3-H), 7,36 (m, 5H, ArH), 7,56 (d, 1H, 2-H), $J_{2,3}$ =8,3, $J_{5a,5b}$ =13,5, $J_{5a,6a}$ =4,4, $J_{5a,6b}$ =3,6, $J_{5b,6a}$ =12,3, $J_{5b,6b}$ =5,5, $J_{6a,6b}$ =13,0, $J_{6a,7}$ =7,0, $J_{6b,7}$ =10,4, $J_{7,\text{NH}}$ =7,8, $J_{7,8}$ =4,9, $J_{7,9}$ =2,0, $J_{8,9}$ =11,2 Hz

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ =31,0 (C-5), 39,4 (C-6), 49,4 (C-7), 66,9 (CH_2Ph), 98,6 (C-1), 124,67 (C-4), 128,2, 128,5, 128,5 (3 CHar), 132,7 (C-3), 133,6 (C-9), 135,1 (C-8), 137,9 (C-2), 136,3, 140,9, 141,2 (Car-s, C-4a, C-9a), 155,5 (NCO)

HRMS (ESI) : calc. pour $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{BrINO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 497,9560 et 499,9539; trouvé : 497,9563 et 499,9541

15. 7-Benzyloxycarbonylamino-4-bromo-1-phényl-6,7-dihydro-5H-benzocycloheptène
(**17**)



À une solution de **16** (12 mg, 0,24 mmol) et de PhB(OH)_2 (30 mg, 0,24 mmol) dans le THF (8 mL) sont ajoutés $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (14 mg, 0,012 mmol) et une solution de K_2CO_3 (320 mg, 2,4 mmol, 10 éq.) dans H_2O (8 mL). La solution est alors agitée sous Ar à 70°C pendant 5 h. De l'eau (20 mL) est ensuite ajoutée et la solution est extraite par AcOEt (3×20 mL), les phases organiques sont lavées par une solution de NaCl saturée (10 mL), séchées (MgSO_4) et concentrées pour donner **17** (98 mg, 91 %) sous forme d'une résine beige après purification par chromatographie sur colonne (AcOEt / cyclohexane 9:1).

IR (KBr) : ν =3314, 2953, 2924, 2855, 1686, 1542, 1536, 1420, 1302, 1256, 702 cm^{-1}

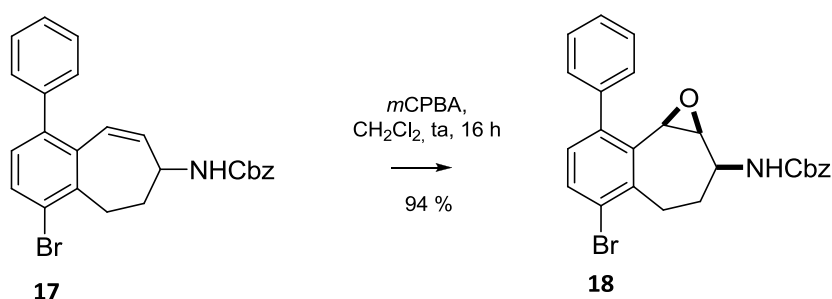
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ =2,06 (dddd, 1H, 6-Hb), 2,50 (dddd, 1H, 6-Ha), 2,69 (ddd, 1H, 5-Hb), 3,23 (ddd, 1H, 5-Ha), 4,35 (dddd, 1H, 7-H), 4,95 (d, 1H, 7-NH), 5,11 (s, 2H, CH_2Ph), 5,90 (dd, 1H, 8-H), 6,33 (d, 1H, 9-H), 7,04 (d, 1H, 2-H), 7,36 (m, 10 ArH), 7,52 (d, 1H, 3-H), $J_{2,3}$ =8,2,

$J_{5a,5b}=13,8$, $J_{5a,6a}=4,1$, $J_{5a,6b}=4,1$, $J_{5b,6a}=11,7$, $J_{5b,6b}=4,6$, $J_{6a,6b}=13,2$, $J_{6a,7}=6,9$, $J_{6b,7}=9,6$, $J_{NH,7}=8,5$,
 $J_{7,8}=4,6$, $J_{7,9}=1,5$, $J_{8,9}=11,3$ Hz

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : $\delta=30,3$ (C-5), 38,6 (C-6), 50,1 (C-7), 66,8 (CH_2Ph), 123,4 (C-4), 127,3, 128,1 (3C), 128,5, 129,0 (6 CHar), 129,6 (C-9, C-2), 131,3 (C-3), 133,6 (C-8), 136,3, 136,8 (Car-s, C-9a), 140,0, 141,0 (Car-s, C-4a), 155,5 (NCO)

HRMS (ESI) : calc. pour $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{BrNO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 448,0907; trouvé : 448,0901

16. *cis*-7-Benzyloxycarbonylamino-1-bromo-5,6-époxy-4-phényl-6,7,8,9-tetrahydro-5H-benzocycloheptène (**18**)



Une solution de **17** (90 mg, 0,20 mmol) et de *m*CPBA (69 mg, 0,4 mmol, 2 éq.) dans CH_2Cl_2 (20 mL) est agitée sous Ar à 40 °C pendant 16 h. Une solution aqueuse de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,4 M dans NaHCO_3 1N (35 mL) est alors ajoutée et le mélange est agité à ta pendant 30 min supplémentaires. La solution est extraite par AcOEt (3 × 20 mL), les phases organiques sont lavées par une solution de NaCl saturée (10 mL), séchées (MgSO_4) et concentrées pour donner **18** (87 mg, 94 %) sous forme de cristaux incolores.

Pf : 104 °C

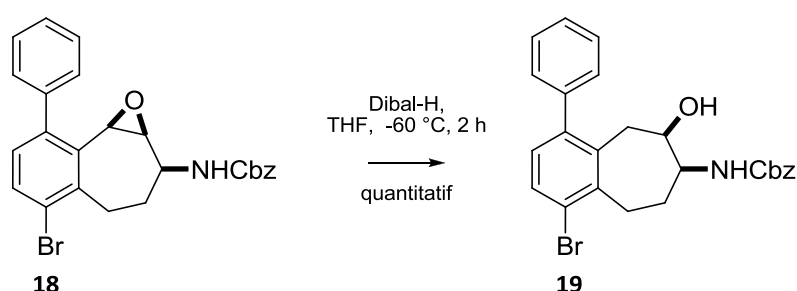
IR (KBr) : $\nu=3306$, 2930, 1683, 1534, 1307, 1260, 701 cm^{-1}

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : $\delta=1,64$ (dddd, 1H, 8-Hb), 2,13 (dddd, 1H, 8-Ha), 2,57 (ddd, 1H, 9-Hb), 3,51 (ddd, 1H, 9-Ha), 3,59 (ddd, 1H, 6-H), 3,77 (d, 1H, 5-H), 4,42 (dddd, 1H, 7-H), 4,98 (d, 1H, 7-NH), 5,10 (s, 2H, CH_2Ph), 7,05 (d, 1H, 3-H), 7,30-7,45 (m, 10H, ArH), 7,61 (d, 1H, 2-H),
 $J_{2,3}=8,2$, $J_{5,6}=4,2$, $J_{6,7}=3,5$, $^4J_{6,8a}=1,4$, $J_{7,8a}=5,3$, $J_{7,8b}=10,4$, $J_{7,NH}=9,1$, $J_{8a,8b}=13,7$, $J_{8a,9a}=8,4$,
 $J_{8a,9b}=1,6$, $J_{8b,9a}=1,6$, $J_{8b,9b}=10,3$, $J_{9a,9b}=15,6$ Hz

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ =29,7 (C-9), 30,1 (C-8), 51,4 (C-7), 58,0 (C-5), 60,9 (C-6), 66,8 (CH_2Ph), 123,6 (C-1), 127,7, 128,0, 128,1, 128,1, 128,5, 129,5, 129,7 (6 CHar, C-3), 133,0 (C-2), 132,2, 136,3 (C-4, Car-s(Ph)), 139,9 (C-4a), 141,1 (Car-s(Bn)), 146,5 (C-9a), 155,6 (NCO)

HRMS (ESI) : calc. pour $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{BrNO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 464,0855 et 466,0835; trouvé : 464,0849 et 466,0833

17. *cis*-7-Benzyloxycarbonylamino-1-bromo-4-phényl-6,7,8,9-tetrahydro-5H-benzocycloheptèn-6-ol (**19**)



À une solution de **18** (80 mg, 0,172 mmol) dans le THF sec (4 mL) à $-78\text{ }^\circ\text{C}$ est ajouté goutte-à-goutte du Dibal-H (1 M dans le toluène, 1,2 mL, 1,2 mmol, 7 éq.). La solution est alors agitée à $-30\text{ }^\circ\text{C}$ pendant 1 h. H_2O (10 mL) et AcOEt (20 mL) sont ajoutés et le mélange est agité pendant 30 min supplémentaires. Le précipité formé est filtré et lavé 3 fois par H_2O et AcOEt. La phase aqueuse du filtrat est extraite par AcOEt ($3 \times 20\text{ mL}$) puis les phases organiques sont rassemblées, lavées par une solution de NaCl saturée (20 mL), séchées (MgSO_4) et concentrées pour donner **19** (80 mg, quant.) sous forme d'un solide beige.

Pf : $150\text{ }^\circ\text{C}$

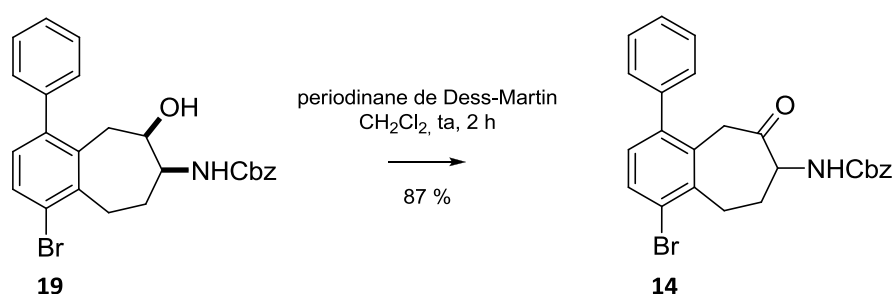
IR (KBr) : ν =3582, 3335, 2926, 2854, 1665, 1541, 1451, 1265, 1078, 1046, 1018, 697 cm^{-1}

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , 323 K) : δ =1,59 (ddt, 1H, 8-Hb), 2,07 (dddt, 1H, 8-Ha), 2,80 (ddd, 1H, 9-Hb), 2,88 (dd, 1H, 5-Hb), 3,27 (dd, 1H, 5-Ha), 3,48 (ddd, 1H, 9-Ha), 3,83 (dddd, 1H, 7-H), 4,03 (dddd, 1H, 6-H), 5,11 (s, 2H, CH_2Ph), 5,12 (d, 1H, 7-NH), 6,98 (d, 1H, 3-H), 7,30-7,45 (m, 10H, ArH), 7,51 (d, 1H, 2-H), $J_{2,3}=8,2$, $J_{5a,5b}=14,6$, $J_{5a,6}=8,2$, $J_{5b,6}=1,4$, $J_{6,7}=2,8$, $^4J_{6,8a}=1,3$, $J_{7,\text{NH}}=8,4$, $J_{7,8a}=4,5$, $J_{7,8b}=11,2$, $J_{8a,8b}=13,8$, $J_{8a,9a}=8,3$, $J_{8a,9b}=1,2$, $J_{8b,9a}=2,0$, $J_{8b,9b}=11,2$, $J_{9a,9b}=14,7$ Hz

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ =27,2 (C-8), 30,6 (C-9), 34,6 (C-5), 57,1 (C-7), 66,8 (CH_2Ph), 68,8 (C-6), 123,6 (C-1), 127,2, 128,1, 128,2, 128,2, 128,5, 129,4 (6 CHar), 129,6 (C-3), 131,1 (C-2), 134,2 (C-4), 136,3 (Car-s(Ph)), 141,0 (Car-s(Bn)), 141,5 (C-4a), 143,6 (C-9a), 155,5 (NCO)

HRMS (ESI) : calc. pour $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{BrNO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 466,1012 et 468,0991; trouvé : 466,0993 et 468,0990

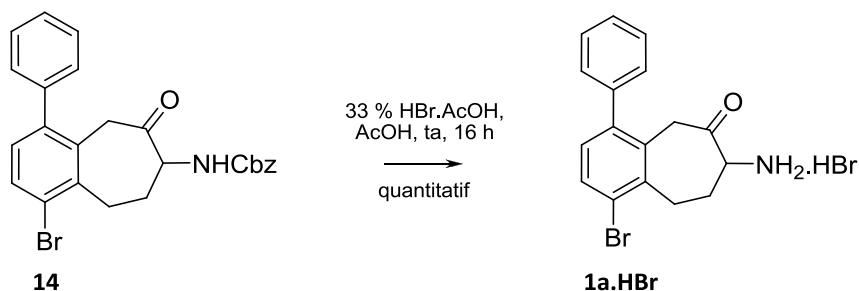
18. 7-(Benzyloxycarbonyl)amino-1-bromo-4-phényl-5,7,8,9-tetrahydrobenzocycloheptèn-6-one (**14**) : Méthode B



À une solution de **19** (75 mg, 0,16 mmol) dans le CH_2Cl_2 (13 mL) est ajouté du périodinanane de Dess-Martin (82 mg, 0,19 mmol, 1,2 éq.). Le mélange est alors agité pendant 2 h à ta puis dilué par AcOEt (10 mL) et une solution aqueuse de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 1 M (10 mL). Après 2 h d'agitation supplémentaires, la phase aqueuse est extraite par AcOEt (3×20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées par une solution de NaCl saturée (10 mL), séchées (MgSO_4) et concentrées pour donner **14** (65 mg, 87 %) après purification par chromatographie sur colonne (AcOEt / cyclohexane 8:2).

Les analyses physico-chimiques réalisées ont donné les mêmes résultats qu'avec la méthode A.

19. Bromhydrate de la 1-bromo-4-phényl-7-amino-5,7,8,9-tetrahydro-6H-benzocycloheptène-6-one (**1a.HBr**)



Une solution de **14** (1,0 g, 2,15 mmol) dans AcOH (33 mL) et HBr 33 % dans AcOH (33 mL) est agitée à ta pendant 16 h. Après évaporation du solvant, le résidu est cristallisé puis lavé par Et₂O pour donner **1a.HBr** (795 mg, quantitatif) sous forme de cristaux incolores.

Pf : > 200 °C

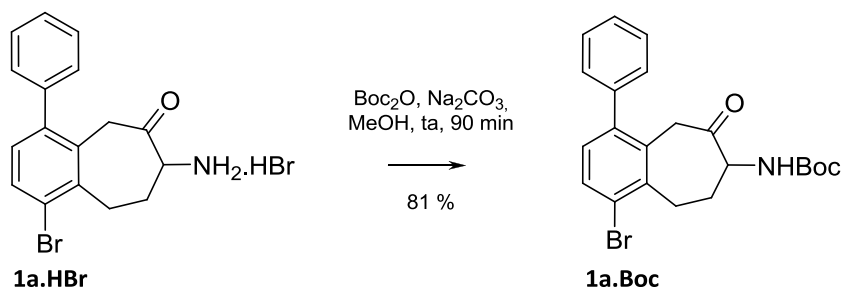
IR (KBr) : $\nu=794, 770, 825, 1454, 1496, 1507, 1720, 2931, 3423 \text{ cm}^{-1}$

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) : $\delta=1,76$ (dddd, 1H, 8-Hb), $2,58$ (dddd, 1H, 8-Ha), $3,44$ (ddd, 1H, 9-Hb), $3,52$ (ddd, 1H, 9-Ha), $3,86$ (d, 1H, 5-Hb), $4,04$ (d, 1H, 5-Ha), $4,32$ (dd, 1H, 7-H), $7,12$ (d, 1H, 3-H), $7,35\text{e}7,45$ (m, 5H, ArH), $7,62$ (d, 1H, 2-H), $J_{2,3}=8,3$, $J_{5a,5b}=15,3$, $J_{7,8a}=7,6$, $J_{7,8b}=11,8$, $J_{8a,8b}=12,8$, $J_{8a,9a}=9,6$, $J_{8a,9b}=3,6$, $J_{8b,9a}=3,6$, $J_{8b,9b}=8,2$, $J_{9a,9b}=15,0 \text{ Hz}$

Ces données sont similaires à celles décrites pour le chlorhydrate. (Ref. 190)

HRMS (ESI) : calc. pour C₁₇H₁₇BrNO [M+H]⁺ : 330,0488 et 332,0469; trouvé : 330,0458 et 332,0433

20. 1-Bromo-4-phényl-7-*tert*-butyloxycarbonylamino-5,7,8,9-tetrahydrobenzocycloheptèn-6-one (**1a.Boc**)



Une solution de **1a.HBr** (750 mg, 1,82 mmol) dans MeOH (40 mL) en présence de Boc_2O (1,54 g, 3,64 mmol, 2 éq.) et de Na_2CO_3 (427 mg, 2,2 éq.) est agitée à ta pendant 90 min. La solution est diluée par H_2O (10 mL) puis extraite par AcOEt (3 × 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées par une solution de NaCl saturée (10 mL), séchées (MgSO_4) et concentrées pour donner **1a.Boc** (745 mg, 95 %) sous forme de cristaux incolores après lavage par $i\text{-Pr}_2\text{O}$.

Pf : 144 – 146 °C (lit. 144 – 150 °C) (Ref. 190)

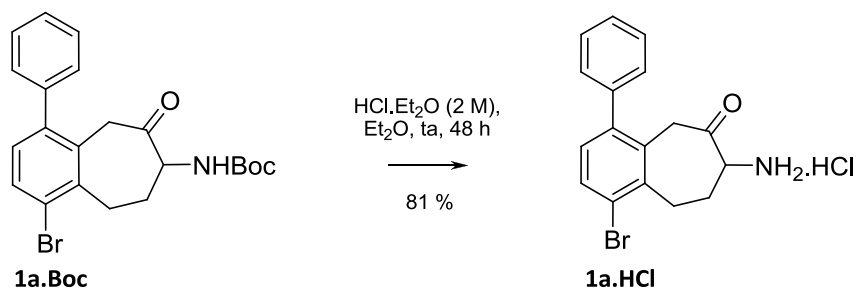
IR (KBr) : $\nu = 3300, 2978, 2934, 1725, 1675, 1544, 1453, 1366, 1185\text{cm}^{-1}$

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : $\delta = 1,42$ (s, 9H, CMe_3), 1,56 (m, 1H, 8-Hb), 2,69 (m, 1H, 8-Ha), 3,18 (ddd, 1H, 9-Hb), 3,31 (ddd, 1H, 9-Ha), 3,73 (d, 1H, 5-Hb), 3,86 (d, 1H, 5-Ha), 4,49 (m, 1H, 7-H), 5,37 (d, 1H, NH), 7,06 (d, 1H, 3-H), 7,30 (d, 2H, 2 Har, $J = 7,2$ Hz), 7,45- 7,38 (m, 3H, 3 Har), 7,55 (d, 1H, 3-H). $J_{2,3}=8,2$, $J_{5a,5b}=17,0$, $J_{7,\text{NH}}=7,2$, $J_{7,8a}=7,9$, $J_{7,8b}=10,8$, $J_{8a,8b}=13,0$, $J_{8a,9a}=4,5$, $J_{8a,9b}=11,0$, $J_{8b,9a}=6,0$, $J_{8b,9b}=4,4$, $J_{9a,9b}=14,7$ Hz

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : $\delta = 27,6$ (CMe_3), 29,8 (C-9), 32,5 (C-8), 44,6 (C-5), 59,1 (C-7), 79,8 (CMe_3), 123,6 (C-1), 131,6, 130,1, 129,5, 128,4, 127,5 133,0 (C-2, C-3, Car-o, Car-m, Car-p), 132,3 (C-4a), 139,8, 139,1 (C-4, Car-s), 142,0 (C-9a), 154,8 (NCO), 205,6 (CO-6)

Les données IR (KBr) et RMN (CDCl_3) sont identiques à celles de la littérature. (Ref. 190)

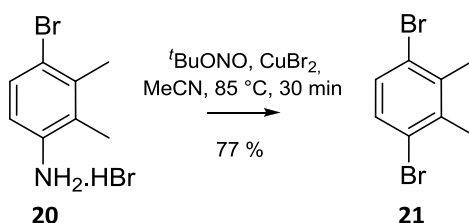
21. Chlorhydrate de la 1-bromo-4-phényl-7-amino-5,7,8,9-tetrahydro-6H-benzocycloheptène-6-one (**1a.HCl**)



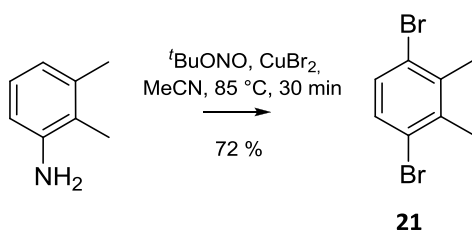
Une solution de **1a.Boc** (740 mg, 1,72 mmol) dans le dioxane (18 mL) et HCl 2N dans Et₂O (36 mL) est agitée à ta pendant 2 jours. Le précipité formé est filtré puis lavé par Et₂O anhydre (3 × 30 mL) pour donner **1a.HCl** (600 mg, 95 %) sous forme d'un solide incolore après recristallisation dans un mélange ⁱPrOH/Et₂O.

Les données IR (KBr) et RMN (CD₃OD) sont identiques à celles obtenues pour le bromhydrate. (Ref. 190)

22. 1,4-Dibromo-2,3-diméthylbenzène (**21**)



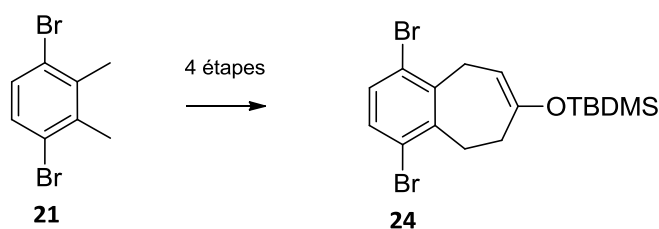
Méthode A (à partir du bromhydrate **20**) : Une solution de la base libre de **20** (8,69 g, 43,5 mmol, obtenue par agitation d'une suspension de **20** dans 20 mL d'Et₂O en présence de 5 g de Na₂CO₃ et de 5 mL d'H₂O puis filtration et évaporation du solvant) dans MeCN (100 mL) est ajoutée sous Ar à une solution de CuBr₂ (9,71 g, 43,5 mmol, 1 éq.) et de ^tBuONO (4,93 g, 5,68 mL, 47,8 mmol, 1,1 éq.) dans MeCN (200 mL). Le mélange est agité à ta pendant 16h puis à 85 °C pendant 30 min. Le milieu est ramené à ta, dilué par AcOEt (200 mL), lavé par une solution de NaCl saturée (2 × 100 mL), séché (MgSO₄) et concentré pour donner **21** (9,79 g, 77 %).



Méthode B (à partir de la 2,3-diméthylaniline) : Une solution de 2,3-diméthylaniline (10 g, 82 mmol) dans MeCN (50 mL) est ajoutée à une solution de CuBr₂ (20 g, 91 mmol, 1,1 éq.) et de ^tBuONO (10,8 mL, 91 mmol, 1,1 éq.) dans MeCN (100 mL). Le mélange est porté au reflux pendant 30 min puis ramené à ta pendant 2 h. Le milieu est dilué par AcOEt (200 mL), lavé par une solution de NaCl saturée (2 × 100 mL), séché (MgSO₄) et concentré pour donner **21** (15,6 g, 72 %) sous forme d'une huile jaune pâle.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ=2,46 (s, 6H, 2 × CH₃), 7,23 (s, 2H, 2Har).

23. 1,4-Dibromo-7-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)-8,9-dihydro-5H-benzocycloheptène
(**24**)



Une solution de **21** (1,22 g, 4,62 mmol) et de *N*-bromosuccinimide finement pulvérisé (1,75 g, 9,71 mmol, 2,1 éq.) dans CCl₄ (70 mL) est agitée sous irradiation par une lampe à mercure HPK125, pendant 1 à 2 h. Le milieu réactionnel est lavé à l'eau, la phase aqueuse est extraite au CH₂Cl₂, puis les phases organiques sont rassemblées, séchées (MgSO₄) et concentrées pour donner le produit attendu sous forme de cristaux orangés (1,83 g, 94 %).

Une solution, sous vive agitation, du produit précédent (1,8 g, 4,27 mmol), de diméthylacétone dicarboxylate (0,92 mL, 6,4 mmol, 1,2 éq.), de NBu₄Br (0,84 g, 2,56 mmol, 0,6 éq.) et de NaHCO₃ (solution à 5 % dans l'eau, 36 mL) dans le CH₂Cl₂ (30 mL) est chauffée à 40 °C sous argon pendant 16 h. La phase organique est séparée, évaporée et le résidu est dissous dans l'AcOEt (200 mL). La phase aqueuse est extraite par l'AcOEt (2 × 50 mL), les phases organiques sont rassemblées, lavées par une solution de NaCl saturée (2 × 50 mL),

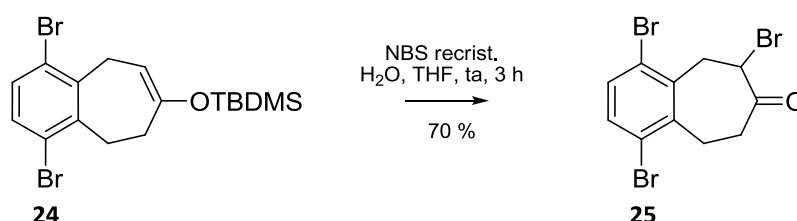
séchées (MgSO₄) et concentrées pour donner une résine incolore (quant.) qui sera utilisée sans purification supplémentaire.

Une solution biphasique, sous vive agitation, de NaOH aqueux 1 N (30 mL) et de la résine précédente (1,85 g, 4,26 mmol) dans MeCN (10 mL) est portée au reflux (90 °C) pendant 2 h. Le milieu est ramené à ta, neutralisé par addition progressive de NaHCO₃, puis extrait par AcOEt (2 × 40 mL). La phase organique est lavée par une solution de NaCl saturée (2 × 40 mL), séchée (MgSO₄) et concentrée pour donner la cétone attendue (1,15 g, 85 %) sous forme d'une huile jaune après purification par chromatographie sur colonne (cyclohexane/AcOEt 9:1).

À une solution de la cétone obtenue (1 g, 3,14 mmol) et de NEt₃ (0,53 mL, 3,77 mmol, 1,2 éq.) dans le CH₂Cl₂ sec (20 mL) est ajouté goutte-à-goutte du Me₂^tBuSiOTf (0,8 mL, 3,45 mmol, 1,1 éq.) à 0 °C sous Argon. La solution est placée sous vive agitation à 0°C pendant 1 h. Le milieu est hydrolysé par une solution aqueuse de NaHCO₃ 1N (20 mL) puis extrait par AcOEt (3 × 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées (MgSO₄) et concentrées pour donner **24** (1,36 g, quant.) sous forme d'une résine orangée qui sera utilisée sans purification supplémentaire.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ=0,10 (s, 6H, OSiMe₂), 0,88 (s, 9H, OSi^tBu), 2,31 (m, 2H, 8-CH₂), 3,24 (m, 2H, 9-CH₂), 3,58 (dt, 2H, 5-CH₂, J = 6,6 et 1,8 Hz), 5,05 (t, 1H, 6-H, J = 6,6 Hz), 7,25 (s, 2H, 2Har).

24. 1,4,6-Tribromo-5,8,9-trihydrobenzocycloheptan-7-one (**25**)

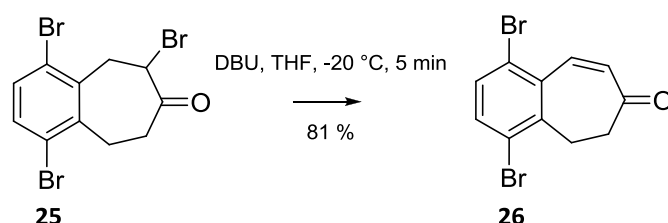


À une solution de **24** (87 mg, 0,2 mmol), sous agitation, dans le THF sec (2 mL) à 0°C sous Ar est ajouté par portions du NBS (43 mg, 0,24 mmol, 1,2 éq.), puis l'agitation est maintenue pendant 3 h à ta. Une solution aqueuse de NaHCO₃ 1N (2 mL) est alors ajoutée puis le milieu est extrait par AcOEt (3 × 5 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées à l'eau, séchées (MgSO₄) et concentrées pour donner la bromocétone **25** (61 mg, 70 %) sous forme d'une huile orangée.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ =2,66 (dddd, 1H, 8-Ha, J = 14,5, 10,1, 3,7 et 1,73 Hz), 3,10 (m, 1H, 9-Ha), 3,17 (m, 1H, 9-Hb), 3,49 (ddd, 1H, 8-Hb, J = 13,4, 7,6 et 2,9 Hz), 3,65 (dd, 1H, 5-Ha, J = 15,0 et 4,0 Hz), 3,77 (dd, 1H, 5-Hb, J = 15,0 et 8,5 Hz), 4,42 (ddd, 1H, 6-H, J = 8,5, 3,9 et 1,7 Hz), 7,32 (d, 1H, Har, J = 8,6 Hz), 7,36 (d, 1H, Har, J = 8,6 Hz)

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ =29,3 (C-9), 37,7, 37,9 (C-5, C-8), 50,2 (C-6), 123,4, 124,9 (C-1, C-4), 132,5, 133,2 (C-2, C-3), 137,5, 141,3 (C-4a, C-9a), 202,0 (C-7)

25. 1,4-Dibromo-5,6-dihydrobenzocycloheptène-7-one (**26**) : Méthode A

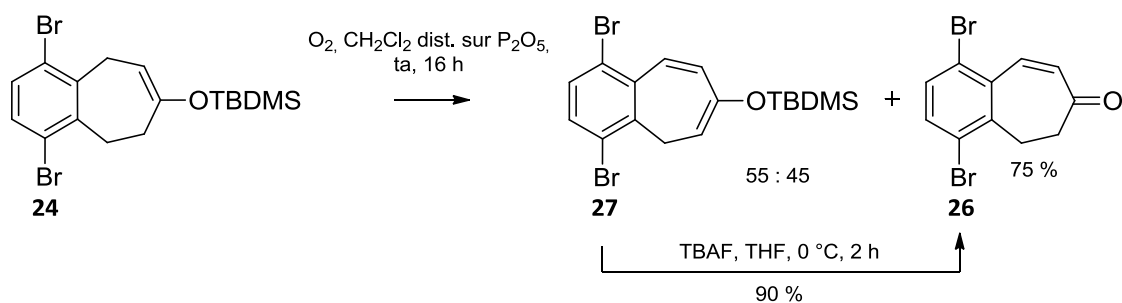


À une solution de bromocétone **25** (186 mg, 0,43 mmol) dans le THF (2 mL) est ajouté du DBU (0,135 mL, 0,9 mmol, 2,1 éq.). La solution obtenue est agitée pendant 5 min à -20 °C. Après dilution par AcOEt (2 mL), la phase organique est lavée par une solution de NaCl saturée (2 mL), séchée (MgSO_4) et concentrée pour donner l'énone **26** (110 mg, 81 %) sous forme d'une résine jaune pâle après purification par chromatographie sur colonne (cyclohexane / AcOEt 99:1).

RMN ^1H (400 MHz, C_6D_6) : δ =2,13 (m, 2H, 8- CH_2), 2,69 (m, 2H, 9- CH_2), 6,00 (d, 1H, 6-H, J = 12,8 Hz), 6,80 (d, 1H, Har, J = 8,6 Hz), 6,82 (d, 1H, Har, J = 8,6 Hz), 6,94 (d, 1H, 5-H, J = 12,8 Hz)

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ =29,0 (C-9), 43,2 (C-8), 123,0 (C-1), 125,3 (C-4), 131,1 (C-6), 132,5 (C-3), 134,5 (C-2), 135,2 (C-4a), 139,2 (C-5), 142,7 (C-9a), 200,9 (C-7)

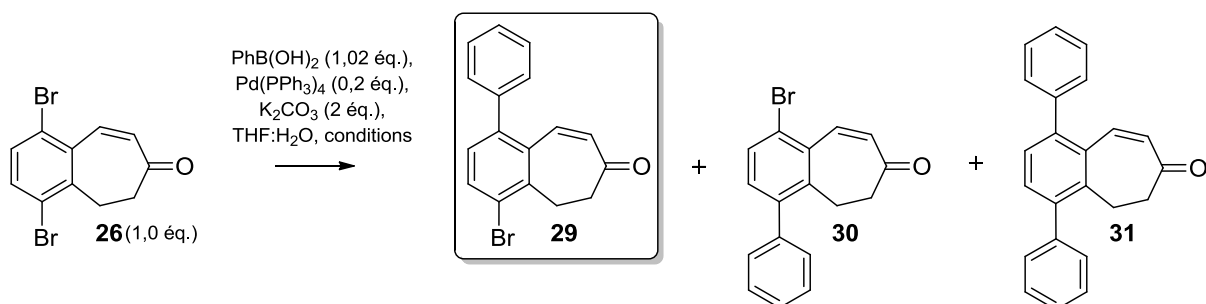
26. 1,4-Dibromo-5,6-dihydrobenzocycloheptèn-7-one (**26**) : Méthode B



Une solution de **24** (87 mg, 0,2 mmol) dans CH_2Cl_2 sec (2 mL) est placée sous atmosphère de O_2 et agitée à ta pendant 16 h. Le milieu est alors concentré pour donner un mélange d'éther silylé **27** et d' α -énone **26** (75 %, mélange 55:45). Ce résidu est repris dans le THF sec (2 mL) puis du TBAF (1M dans THF, 0,5 mL, 0,5 mmol, 2,5 éq.) est ajouté à 0 °C. Le milieu est alors agité à cette température pendant 2h puis dilué par AcOEt (2 mL) et H_2O (2 mL). La phase aqueuse est extraite par AcOEt, les phases organiques sont rassemblées, lavées par une solution de NaCl saturée (2×5 mL), séchées ($MgSO_4$) et concentrées pour donner **26** (57 mg, 90 %) sous forme d'une résine jaune pâle après purification par chromatographie sur colonne (cyclohexane / AcOEt 95:5).

Les données RMN 1H sont similaires à celles décrites précédemment.

27. Etude des conditions de couplage de Suzuki-Miyaura sur le composé **26**



À une solution de **26** (10 mg, 0,03 mmol) et de $PhB(OH)_2$ (3,9 mg, 0,032 mmol, 1,2 éq.) dans un mélange THF/ H_2O (4:1 à 8:1) sont ajoutés $Pd(PPh_3)_4$ (7 mg, 0,006 mmol, 0,02 éq.) et K_2CO_3 (8,7 mg, 0,06 mmol, 2 éq.). La solution est alors placée sous irradiation micro-onde (125 °C, 200W, 15 à 25 min).

Entrées	THF : H ₂ O	Conditions (micro-ondes)	26 ^a	29 ^a	30 ^a	31 ^a	2 produits non identifiés ^{a,b}	29 : 30
A	4 : 1	25 min, 125 °C, 200 W	5	60	10	15	10	85 : 15
B	5 : 1	25 min, 125 °C, 200 W	5	60	10	15	10	85 : 15
C	8 : 1	25 min, 125 °C, 200 W	5	60	10	15	5	85 : 15
D	8 : 1	15 min, 125 °C, 200 W	15	65	> 5	10	< 5	90 : 10
E ^c	8 : 1	15 min, 125 °C, 200 W	20	60	< 5	15	ε	90 : 10

^a pourcentage déterminé avec approximation à partir d'analyse ¹H RMN du brut - un étalon interne n'a pas été employé

^b les produits non identifiés sont en proportion 50 : 50

^c 0,2 éq. de dppf a également été employé

La composition du milieu après réaction a pu être déterminée par analyse RMN ¹H. Les composés **29**, **30** et **31** ont pu être isolés par chromatographie sur plaque préparative (cyclohexane/AcOEt 8:2) et caractérisés.

1-Bromo-4-phényl-5,6-dihydrobenzocycloheptène-7-one (**29**)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ=2,81 (m, 2H, 8-CH₂), 3,34 (m, 2H, 9-CH₂), 6,14 (d, 1H, 6-H, *J* = 12,7 Hz), 6,97 (d, 1H, 5-H, *J* = 12,7 Hz), 7,15 (d, 1H, 3-H, *J* = 8,2 Hz), 7,30 (dd, 2H, Har, *J* = 7,3 et 2,0 Hz), 7,42 (m, 3H, Har), 7,65 (d, 1H, 2-H, *J* = 8,2 Hz)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ=28,5 (C-9), 43,2 (C-8), 123,2 (C-1), 128,0 (Car), 128,4 (Car), 129,7 (C-6), 129,8 (C-3), 129,9 (Car), 133,5 (C-2), 140,1 (C-5), 141,2 (C-9a), 202,2 (C-7), 134,0, 139,6, 143,6 (C^{IV} non attribués C-4a, C-4 et Car)

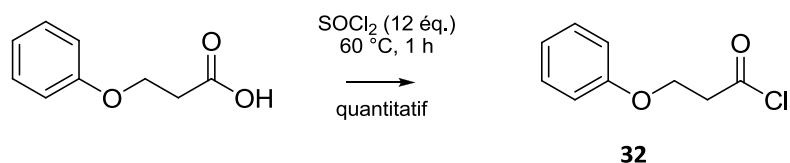
4-Bromo-1-phényl-5,6-dihydrobenzocycloheptène-7-one (**30**)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ=2,67 (m, 2H, 8-CH₂), 2,95 (m, 2H, 9-CH₂), 6,21 (d, 1H, 6-H, *J* = 12,8 Hz), 7,01 (d, 1H, 5-H, *J* = 12,8 Hz), 7,35 (m, 7H, 2-H, 3-H, 5Har)

1,4-Diphényl-5,6-dihydrobenzocycloheptène-7-one (**31**)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ=2,74 (m, 2H, 8-CH₂), 3,00 (m, 2H, 9-CH₂), 6,16 (d, 1H, 6-H, *J* = 12,8 Hz), 7,10 (d, 1H, 5-H, *J* = 12,8 Hz), 7,40 (m, 7H, 2-H, 3-H, 5Har)

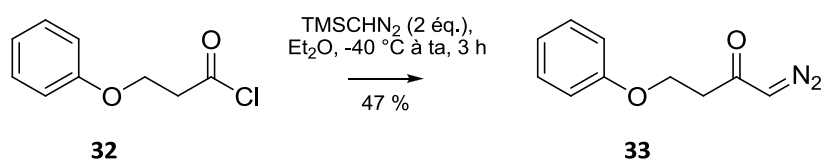
28. Chlorure de 3-phénoxypropanoyle (**32**)



Une solution d'acide 3-phénoxypropanoïque (100 mg, 0,6 mmol) dans $SOCl_2$ (0,528 mL, 7,2 mmol, 12 éq.) est agitée à 60 °C pendant 1 h. Le milieu est alors concentré pour donner **32** (110 mg, quant.) sous forme d'une huile jaune qui sera utilisée sans purification supplémentaire.

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ =3,34 (t, 2H, 2- CH_2 , J = 5,8 Hz), 4,27 (t, 2H, 3- CH_2 , J = 5,5 Hz), 6,90 (d, 1H, Har-p, J = 7,4 Hz), 6,99 (t, 2H, 2Har-o, J = 7,4 Hz), 7,30 (q, 2H, 2Har-m, J = 7,4 Hz)

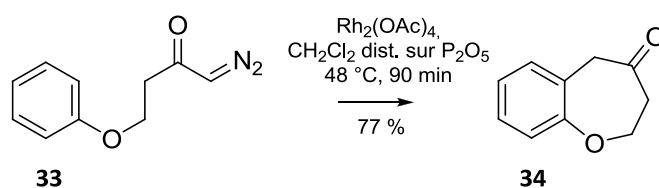
29. 1-Diazo-4-phénoxybutan-2-one (**33**)



À une solution de $TMSCHN_2$ (3 mL, 1 mmol, 2 éq.) dans Et_2O (1,8 mL) à -40 °C est ajoutée goutte-à-goutte une solution de **32** (96 mg, 0,5 mmol) et de CaO (40 mg, 0,65 mmol, 1,3 éq.) dans Et_2O (3,6 mL). Le mélange est alors agité à ta pendant 3 h. La solution est alors évaporée pour donner **33** (45 mg, 47 %) sous forme d'une huile jaune après purification par chromatographie sur colonne (cyclohexane / $AcOEt$ 10:0 à 8:2).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ =2,80 (m, 2H, 3- CH_2), 4,29 (t, 2H, 4- CH_2 , J = 6,2 Hz), 5,42 (s, 1H, 1-H), 6,92 (d, 1H, Har-p, J = 8,2 Hz), 6,98 (t, 2H, 2Har-o, J = 8,2 Hz), 7,30 (q, 2H, 2Har-m, J = 8,2 Hz)

30. 2,3-Dihydrobenzo[*b*]oxepin-4-(5H)-one (**34**)

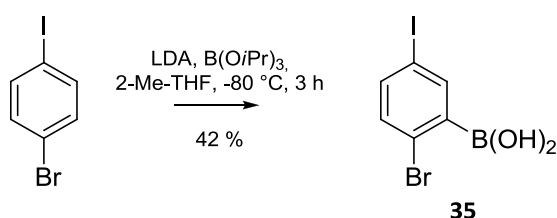


À une solution de $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ (catalytique) dans CH_2Cl_2 (1 mL) est ajoutée goutte-à-goutte une solution de **33** (34 mg, 0,18 mmol) dans CH_2Cl_2 (1 mL). Le mélange est alors agité au reflux (45 °C) pendant 90 min puis ramené à ta, lavé par une solution saturée de NaHCO_3 (5 mL) et par une solution saturée de NaCl (5 mL). La phase organique est alors séchée (MgSO_4) et concentrée pour donner **34** (23 mg, 77 %) sous forme d'une huile jaune après purification par chromatographie sur colonne (cyclohexane / AcOEt 10:0 à 8:2).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ =2,86 (t, 2H, 3- CH_2 , J = 6,1 Hz), 3,85 (t, 2H, 2- CH_2 , J = 6,1 Hz), 4,38 (s, 2H, 5- CH_2), 7,03 (d, 2H, 2Har, J = 7,8 Hz), 7,11 (t, 1H, Har, J = 7,8 Hz), 7,30 (t, 1H, Har, J = 7,8 Hz)

Les données RMN ^1H obtenues pour **34** sont identiques à celles de la littérature (Ref. 89).

31. Acide 2-bromo-5-iodophénylboronique (**35**)



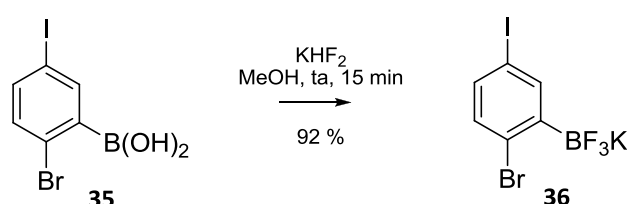
+ 20 % de l'autre régioisomère

À une solution de 4-Bromo-1-iodobenzène (500 mg, 1,77 mmol) et de B(OiPr)_3 (0,49 mL, 2,12 mmol, 1,2 éq.) dans le 2-Me-THF (20 mL) à -80 °C est ajouté du LDA (2 M dans THF, 3,54 mL, 7,08 mmol, 4 éq.). La solution est agitée à -80 °C pendant 3 h puis la réaction est stoppée par addition de H_2SO_4 2 N (20 mL). Le milieu est extrait par AcOEt , les phases organiques sont rassemblées, séchées (MgSO_4) et concentrées pour donner **35** (200 mg, 35 %) sous forme d'un solide incolore après purification par chromatographie sur colonne (cyclohexane / AcOEt 10:0 à 6:4).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : $\delta=7,27$ (d, 1H, 3-H, $J = 8,6$ Hz), $7,60$ (dd, 1H, 4-H, $J = 8,6$ et $2,5$ Hz), $8,23$ (d, 1H, 6-H, $J = 2,5$ Hz)

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) : $\delta=93,6$ (C-5), $125,9$ (C-2), $134,7$ (C-3), $140,7$ (C-4), $142,9$ (C-6), C-1 non déterminé

32. 2-Bromo-5-iodophényltrifluoroborate de potassium (**36**)

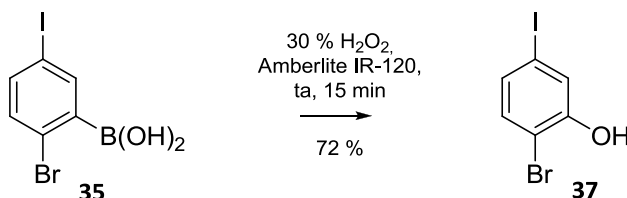


À une solution de **35** (194 mg, 0,59 mmol) dans MeOH (2 mL) est ajoutée goutte-à-goutte une solution de KHF_2 (152 mg, 1,95 mmol, 3,3 éq.) dans H_2O (1 mL). Le milieu est ensuite agité à ta pendant 15 min puis concentré. Le solide obtenu est lavé à l'acétone (2×5 mL) puis à l'acétone chaud (2×5 mL) puis les filtrats sont concentrés. Le résidu est repris dans un minimum d'acétone puis additionné d' Et_2O . Le précipité formé est filtré et séché pour donner **36** (211 mg, 92 %) sous forme d'un solide incolore.

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) : $\delta=7,14$ (d, 1H, 3-H, $J = 8,3$ Hz), $7,30$ (dd, 1H, 4-H, $J = 8,3$ et $2,3$ Hz), $7,82$ (d, 1H, 6-H, $J = 2,3$ Hz)

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) : $\delta=93,3$ (C-5), $128,6$ (C-2), $135,2$ (C-3), $138,0$ (C-4), $144,3$ (C-6), C-1 non déterminé

33. 2-Bromo-5-iodophénol (**37**)



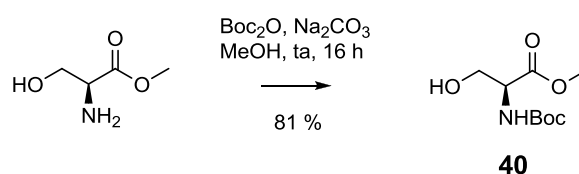
Une solution de **35** (60 mg, 0,18 mmol) et de résine Amberlite IR-120 (8 mg) dans H_2O_2 30 % (1 mL) est agitée à ta pendant 15 min. Le milieu réactionnel est alors filtré, le solide est lavé

par AcOEt (10 mL) puis le filtrat est lavé par NaHCO₃ 10 % (2 × 5 mL). La phase organique est séchée (MgSO₄) et concentrée pour donner **37** (39 mg, 72 %) sous forme d'un solide incolore.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ=5,48 (sl, 1H, OH), 7,12 (dd, 1H, 4-H, *J* = 8,3 et 1,8 Hz), 7,17 (d, 1H, 3-H, *J* = 8,3 Hz), 7,37 (d, 1H, 6-H, *J* = 1,8 Hz)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ=93,0 (C-5), 110,3 (C-2), 125,2 (C-3), 130,9 (C-4), 133,1 (C-6), 152,9 (C-1)

34. Ester méthylique de la L-Boc-sérine (**40**)

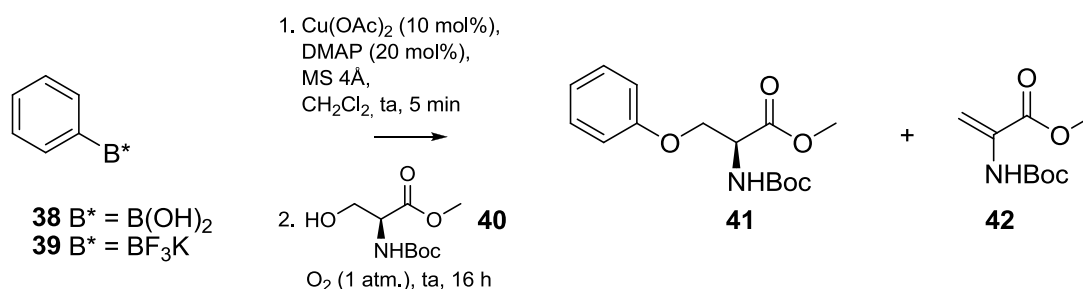


À une solution de l'ester méthylique de la L-sérine (1 g, 6,4 mmol) dans MeOH (10 mL) sont ajoutés Boc₂O (2,1 g, 9,6 mmol, 1,5 éq.) et Na₂CO₃ (1,48 g, 14,1 mmol, 2,2 éq.) puis le mélange est agité à ta pendant 16 h. Le milieu est alors dilué par AcOEt (5 mL) et H₂O (5 mL), la phase aqueuse est extraite par AcOEt (4 × 5 mL) puis les phases organiques sont rassemblées, séchées (MgSO₄) et concentrées pour donner **40** (1,13 g, 81 %) sous forme d'un solide incolore.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ=1,48 (s, 9H, CMe₃), 2,26 (t, 1H, OH, *J* = 5,9 Hz), 3,77 (s, 3H, OCH₃), 4,20 (dd, 1H, 2-Ha, *J* = 9,5 Hz et 3 Hz), 4,40 (dd, 1H, 2-Hb, *J* = 9,5 Hz et 2,5 Hz), 4,66 (dl, 1H, 1-H, *J* = 8,6 Hz), 5,50 (dl, 1H, NH, *J* = 8,6 Hz)

Les données RMN ¹H obtenues pour **40** sont identiques à celles de la littérature. (Ref. 100)

35. Etude des conditions du couplage de Chan-Lam à partir de PhB(OH)₂ et PhBF₃K



Une solution de PhX (X = B(OH)₂ ou BF₃K), de Cu(OAc)₂ (10 mol %), de DMAP (20 mol %) et de tamis moléculaire 4Å dans CH₂Cl₂ (1 mL) est agitée à ta pendant 5 min. Une solution de **40** dans CH₂Cl₂ (2 mL) est alors ajoutée. Le milieu est alors placé sous O₂ et vive agitation pendant 16 h. Le mélange est alors filtré sur silice puis le filtrat est concentré.

Entrées	38/39	40	MS 4Å	40 ^a	41 ^a	42 ^a
A	2 éq. 38	1 éq.	300 g/mol	> 90 %	nd	nd
B	2 éq. 39	1 éq.	300 g/mol	0 %	37 %	63 %
C	1 éq. 39	2 éq.	300 g/mol	16 %	48 %	36 %
D	2 éq. 39	1 éq.	100 g/mol	35 %	29 %	36 %

^a Rendement déterminé par analyse ¹H RMN du brut réactionnel

La composition du milieu après réaction a pu être déterminée par analyse RMN ¹H. Les composés **41** et **42** ont pu être isolés par chromatographie sur colonne (cyclohexane/AcOEt 10:0 à 8:2) et caractérisés.

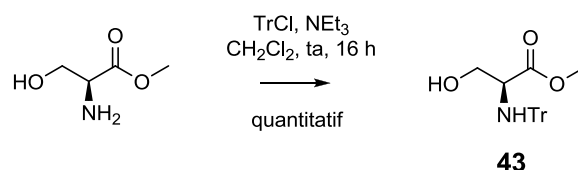
(S)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-3-phénoxypropanoate de méthyle (**41**)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ=1,48 (s, 9H, CMe₃), 3,77 (s, 3H, OCH₃), 4,20 (dd, 1H, 2-Ha, J = 9,5 Hz et 3 Hz), 4,40 (dd, 1H, 2-Hb, J = 9,5 Hz et 2,5 Hz), 4,66 (dl, 1H, 1-H, J = 8,6 Hz), 5,50 (dl, 1H, NH, J = 8,6 Hz), 7,28 (t, 2H, 2Har, J = 8,3 Hz), 7,87 (2H, d, 2Har, J = 8,3 Hz), 7,97 (t, 1H, , Har J = 8,3 Hz)

2-(*tert*-butoxycarbonylamino)acrylate de méthyle (**42**) (Ref. 103)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ=1,47 (s, 9H, CMe₃), 3,81 (s, 3H, OCH₃), 5,71 (s, 1H, NH), 6,16 (sl, 1H, H_{trans} / NHBoc), 7,01 (sl, 1H, H_{cis} / NHBoc)

36. Ester méthylique de la L-trityle-sérine (**43**)

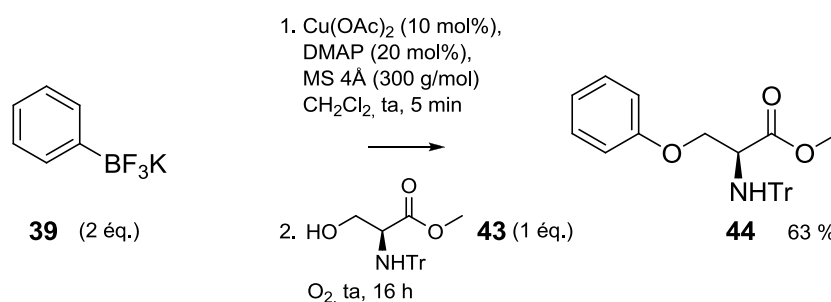


À une solution de l'ester méthylique de la L-sérine (500 mg, 3,21 mmol) sous Ar est ajoutée goutte-à-goutte NEt_3 (1 mL, 6,6 mmol, 2éq.) solubilisée dans CH_2Cl_2 (5 mL). Une solution de TrCl (957 mg, 3,54 mmol, 1,1 éq.) dans CH_2Cl_2 (5 mL) est ensuite ajoutée goutte-à-goutte puis le milieu est agité à ta pendant 16 h. Le milieu réactionnel est alors lavé par une solution saturée de NaHCO_3 ($2 \times 25 \text{ mL}$), la phase aqueuse est extraite par CH_2Cl_2 ($2 \times 20 \text{ mL}$), les phases organiques sont rassemblées, séchées (MgSO_4) et concentrées pour donner **43** (1,11 g, quant.) sous forme de cristaux incolores après purification par chromatographie sur colonne (cyclohexane / AcOEt 10:0 à 7:3).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ =2,26 (t, 1H, OH, $J = 5,9 \text{ Hz}$), 2,97 (sl, 1H, NH), 3,30 (s, 3H, OCH_3), 3,62-3,48 (m, 2H, 2-Ha et 1-H), 3,71 (m, 1H, 2-H), 7,19 (t, 3H, 3Har, $J = 8,3 \text{ Hz}$), 7,27 (t, 6H, 6Har, $J = 8,3 \text{ Hz}$), 7,48 (d, 6H, 6Har, $J = 8,3 \text{ Hz}$)

Les données RMN ^1H obtenues pour **43** sont identiques à celles de la littérature. (Ref. 104)

37. (S)-3-Phénoxy-2-(tritylamino)propanoate de méthyle (**44**) : Méthode A (Chan-Lam)



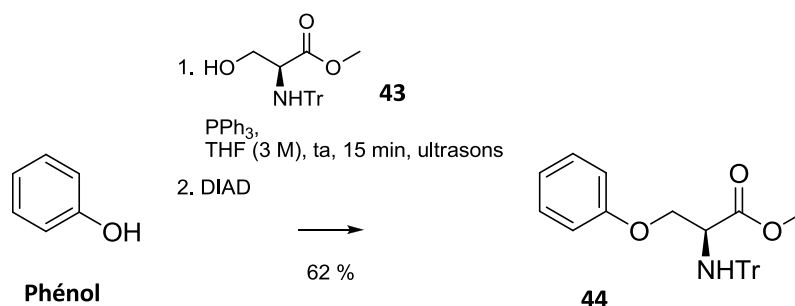
Une solution de PhBF_3K **39** (47,8 mg, 0,26 mmol, 2éq.), de Cu(OAc)_2 (2,36 mg, 0,013mmol, 10 mol%), de DMAP (3,18 mg, 0,026 mmol, 20 mol%) et de tamis moléculaire 4\AA (100 mg) dans CH_2Cl_2 (1 mL) est agitée à ta pendant 5 min. Une solution de **43** (47,8 mg, 0,13 mmol) dans CH_2Cl_2 (2 mL) est alors ajoutée. Le milieu est alors placé sous O_2 et vive agitation pendant 16 h. Le mélange est alors filtré sur silice puis le filtrat est concentré pour donner **44** (36 mg,

63 %) sous forme d'une huile incolore après purification par chromatographie sur plaque préparative (cyclohexane / AcOEt 95:5).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ =2,89 (d, 1H, NH, J = 10,3 Hz), 3,22 (s, 3H, OCH_3), 3,73 (ddd, 1H, , 2-H J = 10,3 Hz, 6,5 Hz et 5 Hz), 4,02 (dd, 1H, 3-Ha, J = 9,1 Hz et 6,5 Hz), 4,25 (dd, 1H, 3-Hb, J = 9,1 Hz et 5 Hz), 6,88 (d, 2H, 2Har, J = 7,4 Hz), 6,95 (t, 1H, Har, J = 7,4 Hz), 7,20 (t, 2H, 2Har, J = 7,4 Hz), 7,36-7,22 (m, 9H, 9Har), 7,52 (d, 6H, 6Har, J = 7,3 Hz)

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ =51,9 (CO_2Me), 56,2 (C-2), 70,3 (C-3), 71,0 (C-4), 114,6 (C-*o*Ph), 121,1 (C-*p*Ph), 126,5 (C-*p*Tr), 127,9, 128,8 (C-*o*Tr, C-*m*Tr), 129,5 (C-*m*Ph), 145,8 (C^{IV}-Tr), 158,5 (C^{IV}-Ph), 173,6 (CO_2Me)

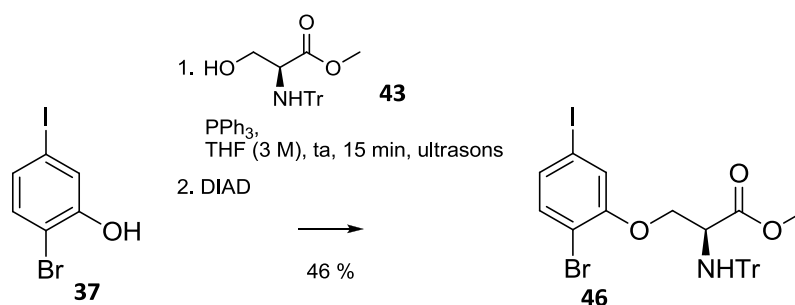
38. (S)-3-Phénoxy-2-(tritylamino)propanoate de méthyle (**44**) : Méthode B (Mitsunobu)



Une solution de PhOH (49 mg, 0,52 mmol), de **43** (206 mg, 0,57 mmol, 1,1 éq.) et de PPh₃ (149 mg, 0,57 mmol, 1,1 éq.) dans le THF (0,2 mL) est placée sous irradiation ultrason. Après 2 min de réaction, du DIAD (0,115 mL, 0,57 mmol, 1,1 éq.) est ajouté goutte-à-goutte et le milieu est irradié pendant 15 min. Le milieu réactionnel est ensuite trituré dans un minimum d'hexane pour donner **44** (140 mg, 62 %) sous forme d'une huile incolore après purification par chromatographie sur colonne (cyclohexane / AcOEt 95:5).

Les données RMN ^1H sont similaires à celles décrites précédemment.

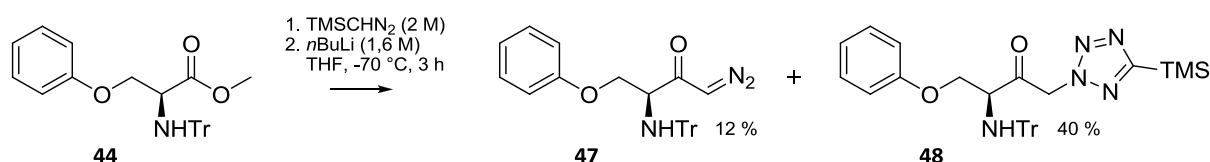
39. (S)-3-(2-Bromo-5-iodophénoxy)-2-(tritylamino)propanoate de méthyle (**46**)



Une solution de **37** (300 mg, 1 mmol), de **43** (435 mg, 1,2 mmol, 1,2 éq.) et de PPh₃ (314 mg, 1,2 mmol, 1,2 éq.) dans le THF (0,3 mL) est placée sous irradiation ultrason. Après 2 min de réaction, du DIAD (0,243 mL, 1,2 mmol, 1,2 éq.) est ajouté goutte-à-goutte et le milieu est irradié pendant 15 min. Le milieu réactionnel est ensuite trituré dans un minimum d'hexane pour donner **46** (295 mg, 46 %) sous forme d'une huile incolore après purification par chromatographie sur colonne (cyclohexane / AcOEt 95:5).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ =2,80 (dl, 1H, NH, J = 9,9 Hz), 3,19 (s, 3H, OCH₃), 3,31 (dd, 1H, 3-Ha, J = 8,5 et 7,0 Hz), 3,48 (dd, 1H, 3-Hb, J = 8,5 et 5,1 Hz), 3,58 (m, 1H, 2-H), 7,0-7,28 (m, 11H, 9Tr + 2Har), 7,45 (d, 6H, oTr, J = 7,1 Hz)

40. Réaction de Arndt-Eistert sur le dérivé **44**



Un mélange de *n*-BuLi (1,6 M dans l'hexane, 0,3 mL, 0,49 mmol, 3 éq.) et de TMSCHN₂ (2 M dans l'hexane, 0,25 mL, 0,49 mmol, 3 éq.) est agité à -78 °C pendant 15 min. Une solution de **44** (72 mg, 0,16 mmol) dans le THF (1 mL) est alors ajoutée goutte-à-goutte et le mélange est agité à -70 °C pendant 3 h. Le milieu réactionnel est traité par de l'eau glacée (2 mL) et extrait par Et₂O (2 × 2 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées par une solution de NaCl saturée (2 × 2 mL), séchées (MgSO₄) et concentrées pour donner **47** (9 mg, 12%) et **48** (36 mg, 40 %) sous forme d'huiles incolores après purification par chromatographie sur colonne (cyclohexane / AcOEt 95:5).

(S)-1-Diazo-4-phénoxy-3-(tritylamino)butan-2-one (**47**)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ =3,24 (m, 2H, 4-H + NH), 3,53 (sl, 1H, 3-H), 4,07 (sl, 1H, 4-H), 5,46 (sl, 1H, 1-H), 6,71 (d, 2H, *o*Ph, J = 7,8 Hz), 6,90 (t, 1H, *p*Ph, J = 7,3 Hz), 7,23 (m, 11H, 9Tr et *m*Ph), 7,47 (d, 2H, *o*Tr, J = 7,6 Hz)

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ =54,7 (C-3), 71,3 (C-4), 82,0 (C-1), 114,5 (*o*Ph ou *m*Ph), 121,2 (*p*Ph), 126,7 (*p*Tr), 127,3, 128,0 (*o*Tr et *m*Tr), 128,9 (CTr), 129,4 (C^{IV} -Tr), 146,0 (*o*Ph ou *m*Ph), 158,2 (C^{IV} -Ph), 196,9 (CO)

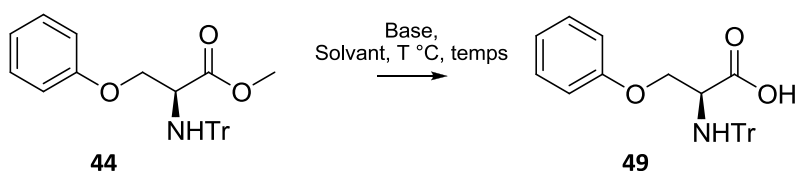
(S)-4-Phénoxy-1-(5-(triméthylsilyl)-2H-tetrazol-2-yl)-3-(tritylamino)butan-2-one (**48**)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ =0,37 (s, 9H, CMe_3), 3,32 (m, 1H, NH), 3,73 (t, 1H, CH, J = 8,5 Hz), 3,94 (m, 1H, 4-Ha), 4,37 (dd, 1H, 4-Hb, J = 8,7 et 4,8 Hz), 4,58 (d, 1H, 1-Ha, J = 17,8 Hz), 5,46 (d, 1H, 1-Hb, J = 17,8 Hz), 6,90 (d, 2H, *o*Ph, J = 7,8 Hz), 6,99 (t, 1H, *p*Ph, J = 7,3 Hz), 7,30 (m, 11H, 9Tr et *m*Ph), 7,49 (d, 2H, *o*Tr, J = 8,0 Hz)

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ =-1,76 (CMe_3), 59,2, 59,7, 70,3, 71,2 (C^{IV}), 77,2 (C^{IV}), 114,6, 121,7, 127,1, 127,2 (C^{IV}), 127,9 (C^{IV}), 127,9 (C^{IV}), 128,3, 128,7, 129,5, 145,6, 157,7 (C^{IV} -Ph), 204,1 (CO)

HRMS (ESI) : calc. pour $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_2\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 562,2633; trouvé : 562,2616

41. Etude des conditions de saponification du dérivé **44**



À une solution de **44** (23 mg, 0,053 mmol) dans le solvant considéré (1 mL) est ajoutée une solution de base (20 éq.) dans H_2O ou H_2O_2 (1 mL). Le mélange est alors agité dans les conditions précisées (température et temps). Le milieu est ensuite dilué par H_2O (2 mL) et AcOEt (2 mL), la phase organique est séchée (MgSO_4) et concentrée.

Entrées	Base	Solvant 50 : 50	Température	Temps de réaction	44 ^a	49 ^a
A	NaOH	H ₂ O : THF	ta puis 70 °C	16 h	100 %	0
B	KOH	H ₂ O : THF	ta puis 70 °C	16 h	100 %	0
C	KOH/MeOH	MeOH : Dioxane	ta, 50 °C et 100 °C	16 h	100 %	0
D	LiOH	H ₂ O : THF	0 °C, ta puis 70 °C	16 h	100 %	0
E	LiOH	H ₂ O ₂ (30 %) : Dioxane	100 °C	16 h	100 %	0
F	LiOH	H ₂ O ₂ (30 %) : MeOH	70 °C	16 h	100 %	0
G	LiOH	H ₂ O : Dioxane	100 °C	96 h	0	100 % (72 %) ^{b,c}

^a rendement déterminé par analyse ¹H RMN du brut réactionnel

^b rendement isolé

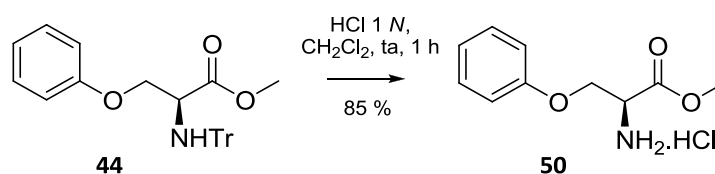
^c expérience non reproductible

La composition du milieu après réaction a pu être déterminée par analyse RMN ¹H. Dans le dernier cas, le composé **49** a pu être isolé (16 mg, 72 %) sous forme d'une huile incolore et caractérisé.

Acide (S)-3-phénoxy-2-(tritylamino)propanoïque (**49**)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ =2,95 (dd, 1H, 3-H, J = 9,2 et 4,4 Hz), 3,71 (t, 1H, 2-H, J = 2,9 Hz), 4,10 (dd, 1H, 3-H, J = 9,2 et 2,9 Hz), 6,70 (d, 2H, *o*Ph, J = 7,7 Hz), 6,94 (t, 1H, *p*Ph, J = 7,3 Hz), 7,25 (m, 11H, *m*Ph + *m*Tr + *p*Tr), 7,45 (d, 6H, *o*Tr, J = 8,4 Hz)

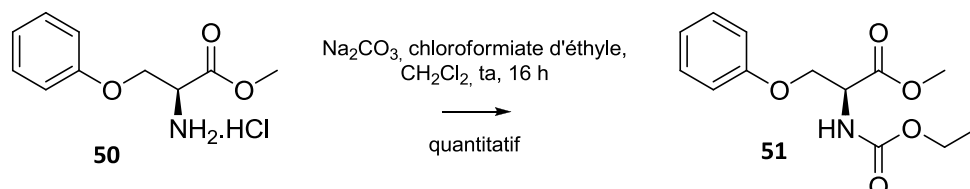
42. Chlohydrate du (S)-2-Amino-3-phénoxypropanoate de méthyle (**50**)



Une solution de **44** (140 mg, 0,32 mmol) dans HCl 2M / Et₂O (2 mL) est agitée à 0 °C pendant 5 min puis laissée au repos à la même température pendant 1 h. Le milieu est centrifugé et le solide obtenu est lavé par Et₂O (2 mL) puis séché sous vide pour donner **50** (62,5 mg, quant.) sous forme d'un solide incolore.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ =3,78 (s, 3H, OCH_3), 4,22 (dd, 1H, 3-Ha, J = 9,4 et 3,2 Hz), 4,41 (dd, 1H, 3-Hb, J = 9,4 et 2,9 Hz), 4,71 (dt, 1H, 2-H, J = 8,6 et 2,9 Hz), 5,63 (d, 2H, NH_2 , J = 8,6 Hz), 6,87 (d, 2H, $o\text{Ph}$, J = 8,8 Hz), 6,98 (t, 1H, $p\text{Ph}$, J = 7,3 Hz), 7,28 (m, 2H, $m\text{Ph}$)

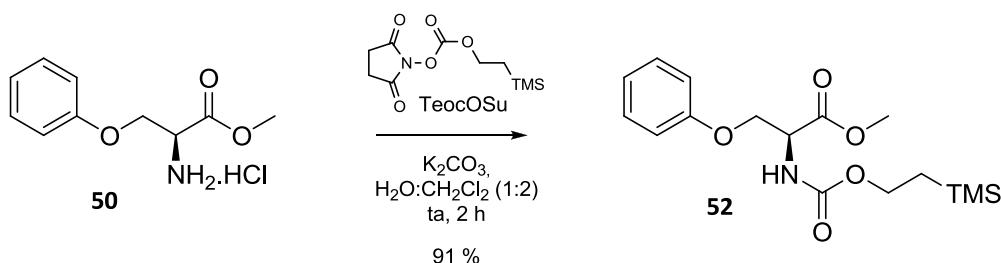
43. (S)-2-(Ethoxycarbonylamino)-3-phénoxypropanoate de méthyle (**51**)



À une solution de **50** (14 mg, 0,072 mmol) et de $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (62 mg, 0,215 mmol, 3 éq.) dans H_2O (0,2 mL) sont ajoutés consécutivement du CH_2Cl_2 (1 mL) et du chloroformate d'éthyle (7 μL , 0,073 mmol, 1,02 éq.). Le milieu est ensuite agité à ta pendant 16 h. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite par CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont rassemblées, séchées (MgSO_4) et concentrées pour donner **51** (19 mg, quant.) sous forme d'une huile incolore.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ =1,26 (t, 3H, OEt , J = 7,2 Hz), 3,78 (s, 3H, OCH_3), 4,15 (d, 2H, OEt , J = 7,2 Hz), 4,22 (dd, 1H, 3-Ha, J = 9,4 et 3,1 Hz), 4,41 (dd, 1H, 3-Hb, J = 9,4 et 2,9 Hz), 4,70 (dt, 1H, 2-H, J = 8,6 et 2,9 Hz), 5,63 (dl, 1H, NH , J = 8,1 Hz), 6,87 (d, 2H, $o\text{Ph}$, J = 8,6 Hz), 6,98 (t, 1H, $p\text{Ph}$, J = 7,3 Hz), 7,29 (m, 2H, $m\text{Ph}$)

44. (S)-3-Phénoxy-2-((2-(triméthylsilyl)éthoxy)carbonylamino)propanoate de méthyle (**52**)

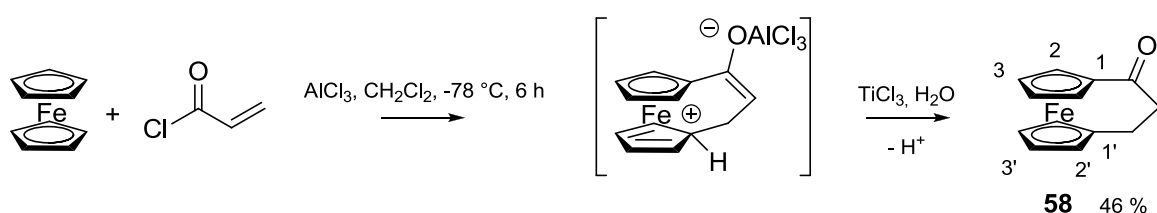


À une solution de **50** (17 mg, 0,09 mmol) et de K_2CO_3 (25 mg, 0,18 mmol, 2 éq.) dans H_2O (0,5 mL) sont ajoutés consécutivement du CH_2Cl_2 (1 mL) et du Teoc-O-succinimide (24 mg, 0,092 mmol, 1,02 éq.). Le milieu est ensuite agité à ta pendant 2 h puis dilué par CH_2Cl_2 (2,5 mL). La phase organique est lavée par une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 (3 \times 5 mL),

puis par une solution de NaCl saturée (3 × 5 mL), séchée (MgSO₄) et concentrée pour donner **52** (27 mg, 91 %) sous forme d'une huile incolore.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ=0,04 (s, 9H, SiMe₃), 1,00 (m, 2H, CH₂), 3,77 (s, 3H, OCH₃), 4,19 (dd, 2H, OCH₂, J = 10,0 et 8,1 Hz), 4,22 (dd, 1H, 3-Ha, J = 9,0 et 3,9 Hz), 4,41 (dd, 1H, 3-Hb, J = 9,1 et 2,7 Hz), 4,70 (dt, 1H, 2-H, J = 8,6 et 2,9 Hz), 5,60 (dl, 1H, NH, J = 8,0 Hz), 6,88 (d, 2H, oPh, J = 8,8 Hz), 6,98 (t, 1H, pPh, J = 7,4 Hz), 7,29 (m, 2H, mPh)

45. [3]-Ferrocénophan-1-one (**58**)



À une solution à -78 °C sous Ar de ferrocène (1 g, 5,37 mmol) et d'AlCl₃ (717 mg, 5,37 mmol, 1 éq.) dans CH₂Cl₂ (11 mL) est ajoutée goutte-à-goutte une solution de chlorure d'acryloyle (0,437 mL, 5,37 mmol, 1 éq.) dans CH₂Cl₂ (2 mL). Le milieu est agité à -78 °C pendant 6 h puis ramené à ta. Le milieu est additionné de TiCl₃ (912 mg, 5,91 mmol, 1,1 éq.) et d'H₂O (10 mL). Le milieu est filtré sur Célite puis les deux phases sont séparées. La phase aqueuse est extraite par CH₂Cl₂ (3 × 10 mL) puis les phases organiques sont rassemblées, lavées par H₂O (40 mL), par une solution de NaCl saturée (40 mL), séchées (MgSO₄) et concentrées pour donner **58** (593 mg, 46 %) sous forme de cristaux rouges après purification par chromatographie sur colonne (cyclohexane/AcOEt 8:2).

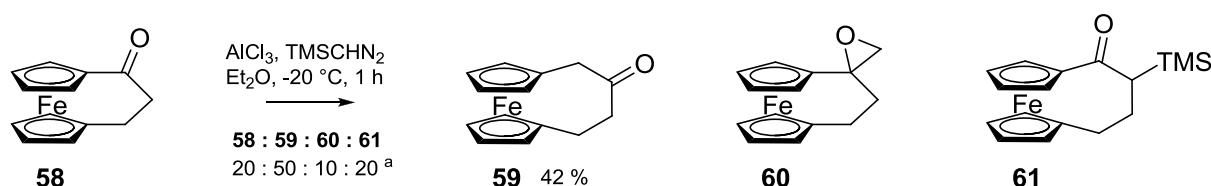
Pf : 144 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ=2,95 (m, 4H, 2-CH₂ et 3-CH₂), 4,03 (s, 2H, Fc-H₂), 4,37 (s, 2H, Fc-H₃), 4,61 (s, 2H, Fc-H₃'), 4,83 (s, 2H, Fc-H₂')

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ=31,7 (C-3), 44,1 (C-2), 69,2 (Fc-3'), 70,3 (Fc-2), 71,1 (Fc-3), 72,7 (Fc-2'), 74,0 (Fc-1), 88,1 (Fc-1'), 211,9 (CO-1)

Les données RMN obtenues pour **58** sont identiques à celles de la littérature.

46. [4]-Ferrocénophan-2-one (**59**)



^a déterminé à partir de l'analyse ^1H RMN du brut

À une solution à 0 °C sous Ar de **58** (28 mg, 0,12 mmol) dans Et₂O (1 mL) sont ajoutés successivement AlCl₃ (cat.) et TMSCHN₂ (0,116 mL, 0,23 mmol, 2 éq.). Le mélange est alors agité à -20 °C pendant 1 h puis additionné d'une solution saturée de NaHCO₃ (3 mL). Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite par Et₂O (2 × 2 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées (MgSO₄) et concentrées pour donner **59**, **60** et **61** (mélange 5:2:1 déterminé par RMN ^1H , 42 % isolé en **59**) qui sont séparés par chromatographie sur colonne (cyclohexane/AcOEt 8:2).

Les données RMN ^1H obtenues pour **59** et **60** sont identiques à celles de la littérature.

[4]-Ferrocénophan-2-one (**59**)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl₃) : δ =2,80 (m, 4H, 3-CH₂ et 4-CH₂), 3,33 (s, 2H, 1-CH₂), 4,09 (s, 2H, Fc-H3), 4,10 (s, 4H, Fc-H3 et Fc-H2'), 4,14 (s, 2H, Fc-H3')

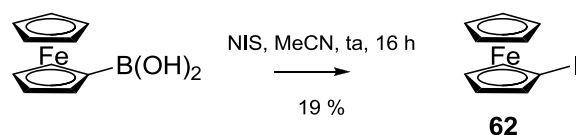
[3]-Ferrocénophan-1-oxirane (**60**)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl₃) : δ =2,72 (m, 2H, 3-CH₂), 2,96 (m, 2H, 2-CH₂), 4,13 (m, 2H, 1'-CH₂), 4,19 (sl, 2H, 2Fc-H), 4,23 (sl, 2H, 2Fc-H), 4,69 (sl, 2H, 2Fc-H), 4,74 (sl, 2H, 2Fc-H)

2-Triméthylsilyl-[4]-ferrocénophan-1-one (**61**)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl₃) : δ =0,14 (s, 9H, SiMe₃), 1,98 (m, 1H, 2-H), 2,22 (m, 2H, 3-CH₂), 2,39 (m, 2H, 4-CH₂), 3,84 (s, 1H, Fc-H), 4,02 (s, 1H, Fc-H), 4,09 (s, 1H, Fc-H), 4,18 (s, 1H, Fc-H), 4,47 (s, 1H, Fc-H), 4,54 (s, 1H, Fc-H), 4,61 (s, 1H, Fc-H), 4,69 (s, 1H, Fc-H). La dispersion des signaux correspondant aux protons du ferrocène est liée à l'asymétrie induite par le groupement TMS.

47. Iodoferrocène (**62**)

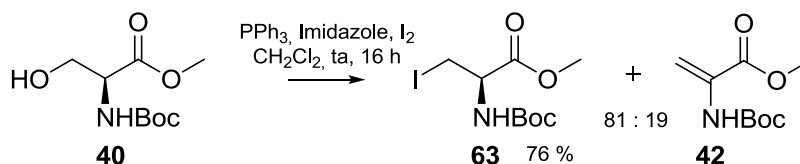


À une solution de Fc-B(OH)_2 (90 mg, 0,39 mmol) dans MeCN (6 mL) est ajouté du *N*-iodosuccinimide (106 mg, 0,47 mmol, 1,2 éq.) puis le mélange est agité à ta pendant 16 h. Le milieu réactionnel est dilué par de l'hexane (5 mL) puis lavé par une solution de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 1M (2×5 mL) et par une solution saturée de NaCl (2×5 mL). La phase organique est séchée (MgSO_4) et concentrée pour donner **62** (23 mg, 19 %) sous forme d'une huile brune.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : $\delta=4,15$ (s, 2H, Fc-H₂), 4,19 (s, 5H, 5Fc-H), 4,41 (s, 2H, Fc-H₃)

Les données RMN ^1H obtenues pour **62** sont identiques à celles de la littérature. (Ref. 171)

48. (*R*)-2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-3-iodopropanoate de méthyle (**63**)



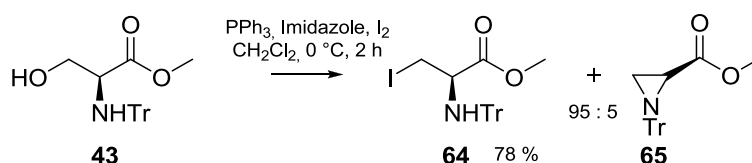
À une solution de PPh_3 (1,69 g, 6,46 mmol, 1,05 éq.) et d'imidazole (440 mg, 6,46 mmol, 1,05 éq.) dans CH_2Cl_2 (30 mL) est ajouté I_2 (1,17 g, 9,24 mmol, 1,5 éq.). La solution est agitée à ta pendant 10 min puis une solution de **40** (1,35 g, 6,16 mmol) dans CH_2Cl_2 (15 mL) est ajoutée goutte à goutte. Le mélange est alors agité pendant 16 h à ta. Le milieu est filtré sur silice puis le filtrat est évaporé pour donner **63** et **42** (mélange 81:19, 540 mg, 76 %) sous forme d'huiles incolores après purification par chromatographie sur colonne (cyclohexane/ AcOEt 95:5).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : $\delta=1,46$ (s, 9H, CMe_3), 3,57 (m, 2H, 3- CH_2), 3,80 (s, 3H, OCH_3), 5,34 (dl, 1H, NH, $J = 8$ Hz)

Les données RMN ^1H obtenues pour **42** sont similaires à celles décrites précédemment.

Les données RMN ^1H obtenues pour **63** sont identiques à celles de la littérature. (Ref.173)

49. (R)-3-Iodo-2-(tritylamino)propanoate de méthyle (**64**)



À une solution de PPh_3 (79 mg, 0,3 mmol, 1 éq.), d'imidazole (21 mg, 0,3 mmol, 1 éq.) et de I_2 (46 mg, 0,36 mmol, 1,2 éq.) dans CH_2Cl_2 (3 mL) est ajoutée une solution de **43** (110 mg, 0,3 mmol) dans CH_2Cl_2 (1 mL). Le mélange est alors agité à ta pendant 2 h puis le milieu est lavé par une solution de NaOH 2M (5 mL) et par une solution de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 1M (5 mL). La phase organique est séchée (MgSO_4) et concentrée pour donner **64** et **65** (mélange 95:5, 120 mg, 82 %) sous forme de solides incolores après purification par chromatographie sur colonne (cyclohexane/ AcOEt 8:2).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ =2,90 (dl, 1H, NH, J = 9,8 Hz), 3,22 (dd, 1H, 3-Ha, J = 9,8 et 7,3 Hz), 3,31 (s, 3H, OCH_3), 3,36 (dd, 1H, 3-Hb, J = 9,8 et 3,5 Hz), 3,50 (ddd, 1H, 2-H, J = 9,8, 7,3 et 3,5 Hz), 7,24-7,34 (m, 9H, $m\text{Tr}$ + $p\text{Tr}$), 7,51 (d, 6H, $o\text{Tr}$, J = 7,3 Hz)

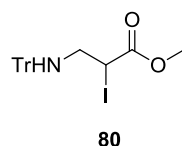
Les données RMN ^1H obtenues pour **64** sont identiques à celles du rotamère majoritaire décrit dans la littérature. (Ref. 174 et 177)

(S)-1-Tritylaziridine-2-carboxylate de méthyle (**65**)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ =1,42 (dd, 1H, 3-Ha, J = 6,3 et 1,5 Hz), 1,90 (dd, 1H, 3-Hb, J = 6,1 et 2,5 Hz), 2,27 (dd, 1H, 2-H, J = 2,8 et 1,7 Hz), 3,77 (s, 3H, OCH_3), 7,18-7,23 (m, 9H, $m\text{Tr}$ + $p\text{Tr}$), 7,46 (d, 6H, $o\text{Tr}$, J = 7,3 Hz)

Dugave *et al.* (Ref. 174) et Swali *et al.* (Ref. 177) ont décrit, d'après leurs analyses ^1H RMN du dérivé iodé **64**, l'obtention de 2 rotamères. Bien qu'ils aient employé les mêmes conditions réactionnelles leurs ratios respectifs sont très différents (1:1 pour Dugave *et al.* et un rotamère minoritaire pour Swali *et al.*).

Lors des essais préliminaires, un produit secondaire, était observé d'après les analyses ^1H RMN. La formation de ce produit variant notablement d'un essai à l'autre, il était peu probable qu'il s'agisse d'un rotamère du dérivé **64**. A ce stade, nous avons émis l'hypothèse qu'il pouvait y avoir une ouverture du cycle de l'aziridine **65** pour donner lieu au dérivé **80**.



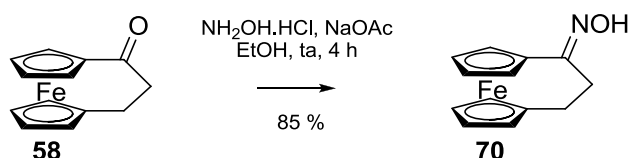
(S)-2-Iodo-3-(tritylamino)propanoate de méthyle (**80**)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ =2,29 (m, 1H, NH), 2,56 (dd, 1H, 3-Ha, J = 6,0 et 12,9 Hz), 2,72 (dd, 1H, 3-Hb, J = 8,3 et 13,0 Hz), 3,77 (s, 3H, OCH_3), 3,50 (dd, 1H, 2-H, J = 6,1 et 8,3 Hz), 7,24-7,34 (m, 9H, *mTr* + *pTr*), 7,51 (d, 6H, *oTr*, J = 7,3 Hz)

Les données RMN ^1H obtenues pour la structure supposée **80** sont identiques à celles du rotamère minoritaire décrit dans la littérature. (Ref. 174 et 177)

Des analyses spectroscopiques supplémentaires permettraient de confirmer ou d'infirmer cette structure.

50. Oxime de la [3]-ferrocénophan-1-one (**70**)

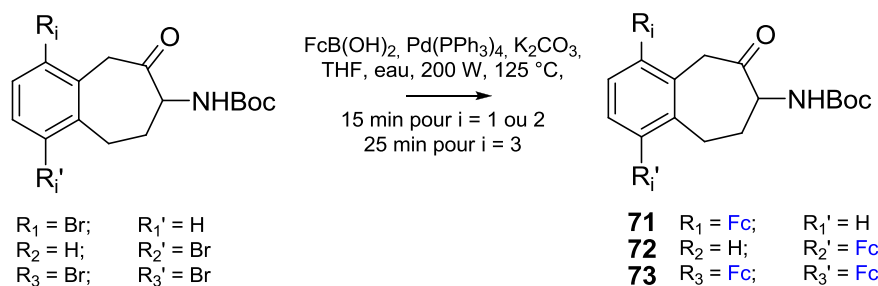


Une solution de **58** (18 mg, 0,075 mmol), de chlorhydrate d'hydroxylamine (6,3 mg, 0,09 mmol, 1,2 éq.) et de NaOAc (12,3 mg, 0,15 mmol, 2 éq.) dans EtOH (1 mL) est agitée à ta pendant 4 h. Le milieu est alors dilué par H_2O (1 mL) et AcOEt (1 mL). Les phases sont séparées, la phase organique est séchée (MgSO_4) et concentrée pour donner **70** (mélange *syn/anti* 1:2, 16 mg, 85 %) sous forme d'un solide orange pâle.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ =2,46 (m, 2H, 3- CH_2 , m+M), 2,83 (m, 0,74H, 2- CH_2 , m), 3,00 (m, 1,26H, 2- CH_2 , M), 4,05 (sl, 2H, 2Fc-H, m+M), 4,21 (sl, 1,26H, 2Fc-H, M), 4,26 (sl, 0,74H, 2Fc-H, m), 4,31 (sl, 0,74H, 2Fc-H, m), 4,35 (sl, 1,26H, 2Fc-H, M), 4,49 (sl, 1,26H, 2Fc-H, M), 4,53 (sl, 0,74H, 2Fc-H, m)

Les données RMN ^1H obtenues pour **70** sont identiques à celles de la littérature. (Ref. 187)

51. Introduction du groupement ferrocényle par couplage de Suzuki-Miyaura (**71**, **72** et **73**)



À une solution de dérivé bromé (17 mg pour les dérivés monobromés, 21 mg pour le dérivé dibromé, 0,05 mmol) et de FcB(OH)_2 (22 mg, 0,1 mmol, 2 éq.) dans un mélange de THF (1 mL) et de H_2O (0,3 mL) sont ajoutés $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (11 mg, 0,01 mmol, 0,2 éq.) et K_2CO_3 (13 mg, 0,1 mmol, 2 éq.). La solution est alors placée sous irradiation micro-onde (125 °C, 200W, 15 min pour les dérivés monobromés et 25 min pour le dérivé dibromé). Le milieu réactionnel est dilué par AcOEt (1 mL) et H_2O (1 mL) puis les phases sont séparées. La phase aqueuse est extraite par AcOEt (3×2 mL), les phases organiques sont rassemblées, séchées (MgSO_4) et concentrées pour donner **71** (12 mg, 53 %), **72** (13 mg, 57 %) et **73** (16 mg, 49 %) sous forme d'huiles orange après purification par chromatographie sur colonne (cyclohexane/ AcOEt 7:3).

7-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-4-ferrocényl-5,7,8,9-tétrahydrobenzocycloheptèn-6-one (**71**)
 RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ =1,43 (s, 9H, CMe_3), 1,50 (m, 1H, 8-Ha), 2,64 (m, 1H, 8-Hb), 2,90 (m, 1H, 9-Ha), 3,03 (m, 1H, 9-Hb), 4,00 (d, 1H, 5-Ha, $J = 14,5$ Hz), 4,12 (d, 1H, 5-Hb, $J = 14,5$ Hz), 4,22 (s, 5H, H-Fc), 4,37 (s, 1H, H-Fc), 4,40 (s, 1H, H-Fc), 4,54 (dt, 1H, 7-H—s, 1H, H-Fc, $J = 10,5$ Hz et 7,0 Hz), 4,81 (s, 1H, H-Fc), 5,43 (d, 1H, NH, $J = 7,0$ Hz); 7,03 (d, 1H, 1-H, $J = 7,2$ Hz), 7,14 (t, 1H, 2-H, $J = 7,2$ Hz), 7,53 (dl, 1H, 3-H, $J = 7,2$ Hz)
 RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ =28,3 (CMe_3), 31,5 (C-8), 34,5 (C-9), 43,1 (C-5), 60,8 (C-7), 68,8 (C-Fc), 69,3 (C-Fc), 70,5 (C-Fc), 70,5 (C-Fc), 72,4 (C-Fc), 79,7 (CMe_3), 88,8 (C-1'), 126,7 (C-1), 127,5 (C-2), 130,3 (C-4), 130,7 (C-3), 138,3 (C-9a), 140,7 (C-4a), 154,9 (NCO), 205,6 (CO-6)
 HRMS (ESI) : calc. pour $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{FeNNaO}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 482,13894; trouvé : 482,13812

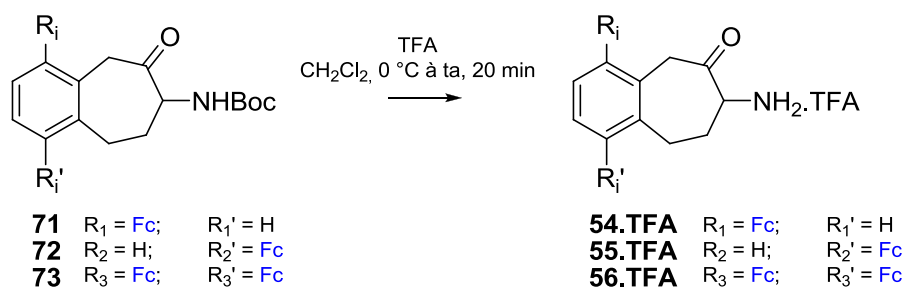
7-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-1-ferrocényl-5,7,8,9-tétrahydrobenzocycloheptèn-6-one (**72**)
 RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ =1,43 (s, 9H, CMe_3), 1,48 (m, 1H, 8-Ha), 2,59 (m, 1H, 8-Hb), 3,05 (m, 1H, 9-Ha), 3,10 (m, 1H, 9-Hb), 3,65 (d, 1H, 5-Ha, $J = 15,7$ Hz), 3,89 (d, 1H, 5-Hb, $J = 15,7$ Hz), 4,27 (s, 5H, H-Fc), 4,37 (sl, 2H, H-Fc), 4,41 (s, 1H, H-Fc), 4,50 (s, 1H, H-Fc), 4,55 (dt, 1H, 7-H, $J = 10,7$ Hz et 7,1 Hz), 5,41 (d, 1H, NH, $J = 7,1$ Hz), 7,04 (d, 1H, 4-H, $J = 7,3$ Hz), 7,13 (t, 1H, 3-H, $J = 7,3$ Hz), 7,54 (dl, 1H, 2-H, $J = 7,3$ Hz)

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ =28,3 (CMe_3), 26,0 (C-9), 34,3 (C-8), 48,3 (C-5), 59,9 (C-7), 67,8 (C-Fc2'a), 67,9 (C-Fc2'b), 69,5 (5 C-Fc), 70,2 (2 C-Fc), 79,7 (CMe_3), 88,0 (C-1'), 126,3 (C-3), 128,0 (C-2), 131,3 (C-4), 129,2-132,8 (C-1,C-4a), 137,6 (C-9a), 155,0 (NCO), 205,6 (CO-6)
 HRMS (ESI) : calc. pour $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{FeNNaO}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 482,13894; trouvé : 482,13812

7-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-1,4-diferrocényl-5,7,8,9-tétrahydrobenzocycloheptèn-6-one
(73)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ =1,43 (s, 9H, CMe_3), 1,55 (m, 1H, 8-Ha), 2,59 (m, 1H, 8-Hb), 3,05 (m, 2H, CH_2 -9), 4,00 (d, 1H, 5-Ha, J = 15,8 Hz), 4,15 (d, 1H, 5-Hb, J = 15,8 Hz), 4,26 (sl, 10H, H-Fc), 4,34 (s, 1H, H-Fc), 4,36 (s, 1H, H-Fc), 4,38 (s, 2H, H-Fc), 4,41 (s, 1H, H-Fc), 4,47 (s, 1H, H-Fc), 4,53 (s, 1H, H-Fc), 4,53 (dt, 1H, 7-H, J = 11,3 Hz et 7,6 Hz), 4,75 (s, 1H, H-Fc), 5,42 (d, 1H, NH, J = 6,7 Hz), 7,48 (dl, 1H, 2-H), 7,57 (dl, 1H, 3-H)
 HRMS (ESI) : calc. pour $\text{C}_{36}\text{H}_{37}\text{Fe}_2\text{NNaO}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 666,13658; trouvé : 666,13423

52. Déprotection – Formation des trifluoroacétates (**54.TFA**, **55.TFA** et **56.TFA**)



À une solution de dérivé ferrocényle (9,6 mg pour les dérivés **71** ou **72**, 13 mg pour le dérivé **73**, 0,02 mmol) dans CH_2Cl_2 (1 mL) à 0 °C est ajouté du TFA (0,5 mL) puis le milieu est agité pendant 20 min à ta. Le milieu est concentré puis le résidu est repris dans AcOEt (1 mL) et filtré sur silice. Le filtrat est alors concentré pour donner **54.TFA** (9 mg, quant.), **55.TFA** (9 mg, quant.) et **56.TFA** (12 mg, quant.) sous forme d'huiles orange.

Trifluoroacétate du 7-amino-4-ferrocényl-5,7,8,9-tétrahydrobenzocycloheptèn-6-one
(54.TFA)

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) : δ =1,69 (qd, 1H, 8-Ha, J = 11,8 Hz et 2,4 Hz), 2,55 (m, 1H, 8-Hb), 3,03 (ddd, 1H, 9-Ha, J = 15,0 Hz et 8,0 Hz et 2,6 Hz), 3,27 (m, 1H, 9-Hb), 4,11 (d, 1H, 5-Ha, J = 13,5 Hz), 4,18 (s, 5H, H-Fc), 4,36 (s, 1H, H-Fc), 4,37 (dd, 1H, 7-H, J = 10,8 Hz et 7,2 Hz), 4,38 (d, 1H, 5-Hb, J = 13,5 Hz), 4,40 (s, 1H, H-Fc), 4,41 (s, 1H, H-Fc), 4,59 (s, 1H, H-Fc), 7,09 (d, 1H, 1-H, J = 7,4 Hz), 7,16 (t, 1H, 2-H, J = 7,4 Hz), 7,60 (dl, 1H, 3-H)

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) : $\delta=31.6$ (C-8) ; 33.2 (C-9) ; 42.8 (C-5) ; 61.5 (C-7) ; 72.0 (C-1') ; 72.0 (C-Fc) ; 72.0 (C-Fc) ; 128.0 (C-1) ; 128.8 (C-2) ; 130.6 (C-4) ; 132.3 (C-3) ; 139.7 (C-9a) ; 142.0 (C-4a) ; 203.2 (CO-6)

HRMS (ESI) : calc. pour $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{FeNO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 360,1046; trouvé : 360,1049

Trifluoroacétate du 7-amino-1-ferrocényl-5,7,8,9-tétrahydrobenzocycloheptèn-6-one

(55.TFA)

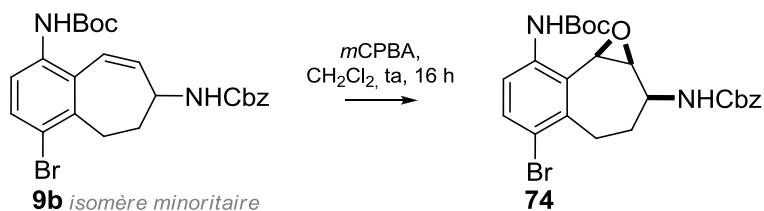
RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) : $\delta=1,70$ (m, 1H, 8-Ha), $2,50$ (m, 1H, 8-Hb), $3,40$ (m, 2H, CH_2 -9), $3,69$ (d, 1H, 5-Ha, $J = 14,7$ Hz), $4,00$ - $4,60$ (m, 9H, H-Fc), $4,14$ (d, 1H, 5-Hb, $J = 14,7$ Hz), $4,31$ (dd, 1H, 7-H, $J = 12,0$ Hz et $7,2$ Hz), $7,08$ (dl, 1H, 4-H), $7,16$ (tl, 1H, 3-H), $7,80$ (dl, 1H, 2-H)

Trifluoroacétate du 7-amino-1,4-diferrocényl-5,7,8,9-tétrahydrobenzocycloheptèn-6-one

(56.TFA)

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) : $\delta=1,58$ (m, 1H, 8-Ha), $2,83$ (m, 1H, 8-Hb), $4,39$ (m, 1H, 7-H). Les autres signaux sont aplanis du fait de la présence de Fe^{3+} , paramagnétique.

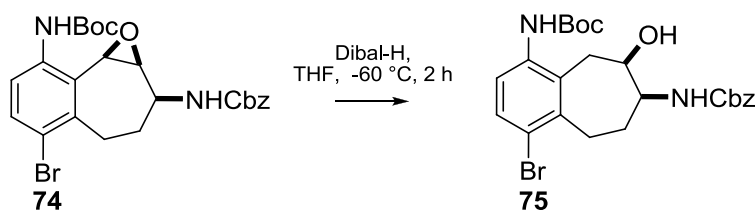
53. 1-Bromo-4-*tert*-butoxycarbonylamino-7-benzoyloxycarbonylamino-6,7,8,9-tétrahydro-5*H*-benzocycloheptèn-6-one (**76**)



Une solution de **9b** (90,5 mg, 0,18 mmol) et de *m*CPBA (64,1 mg, 0,37 mmol, 2 éq.) dans le CH_2Cl_2 (6 mL) est agitée à ta sous Ar pendant 16 h. Une solution aqueuse de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,4 M dans NaHCO_3 1N (6 mL) est alors ajoutée puis le mélange est agité à ta pendant 30 min supplémentaires. Après élimination des insolubles, le milieu est extrait par AcOEt (3×5 mL), les phases organiques sont lavées par une solution de NaHCO_3 1N (2×5 mL) puis par une solution de NaCl saturée (5 mL), séchées (MgSO_4) et concentrées pour donner **74** sous forme de cristaux incolores après lavage par $i\text{Pr}_2\text{O}$.

1-Bromo-4-*tert*-butoxycarbonylamino-7-benzoyloxycarbonylamino-5,6-époxy-6,7,8,9-tétrahydro-5*H*-benzocycloheptène (**74**)

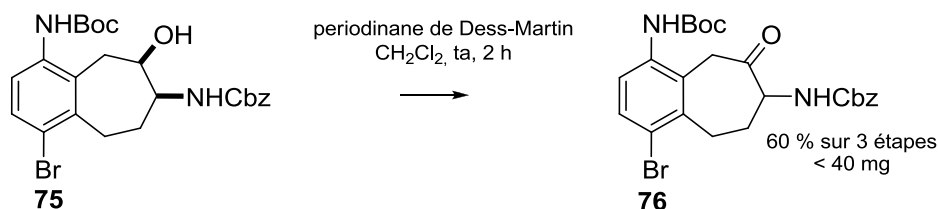
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : mélange de 2 conformères $\delta=1,51$ (s, 9H, CMe_3), $1,68$ - $1,91$ (m, 1H, 8-Hb), $2,3$ (m, 1H, 8-Ha), $2,79$ - $3,01$ (ddd, 1H, 9-Hb), $3,07$ - $3,26$ (dt, 1H, 9-Ha), $3,40$ - $3,53$ (m, 1H, 6-H), $3,60$ - $3,71$ et $4,44$ - $4,56$ (m, 1H, 7-H), $4,01$ - $4,07$ (d, 1H, 5-H), $4,94$ - $4,97$ (s, 1H, NHCbz), $5,03$ - $5,16$ (m, 2H, CH_2Ph), $7,28$ - $7,58$ (m, 7H, Har), $7,78$ - $7,83$ (d, 1H, NHBoc)



À une solution de **74** dans le THF sec (3 mL) à -78 °C est ajouté goutte-à-goutte du Dibal-H (1 M dans le toluène, 5 éq.). La solution est alors agitée à -60 °C pendant 3 h. H₂O (5 mL) et AcOEt (5 mL) sont ajoutés et le mélange est agité pendant 30 min supplémentaires. Le précipité formé est filtré et lavé 3 fois par H₂O et AcOEt. La phase aqueuse du filtrat est extraite par AcOEt (3 × 5 mL) puis les phases organiques sont rassemblées, lavées par une solution de NaCl saturée (5 mL), séchées (MgSO₄) et concentrées pour donner **75** sous forme d'un solide beige.

1-Bromo-4-*tert*-butoxycarbonylamino-7-benzoyloxycarbonylamino-6,7,8,9-tétrahydro-5H-benzocycloheptèn-6-ol (**75**)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ=1,43 (s, 9H, CMe₃), 1,51 (m, 1H, 8-Hb), 1,99 (ddd, 1H, 8-Ha, *J* = 12,7, 7,6 et 4,3 Hz), 2,60 (dd, 1H, 9-Hb, *J* = 14,6 et 12,7 Hz), 2,84 (d, 1H, 5-Hb, *J* = 15,0 Hz), 3,34 (dd, 1H, 9-Ha, *J* = 14,6 et 8,1 Hz), 3,50 (dd, 1H, 5-Ha, *J* = 15,0 et 7,6 Hz), 3,86 (m, 1H, 7-H), 4,21 (dl, 1H, 6-H, *J* = 7,6 Hz), 5,10 (s, 2H, CH₂Ph), 5,40 (dl, 1H, NHCbz, *J* = 9,1 Hz), 6,27 (sl, 1H, NHBoc), 6,90 (d, 1H, 2-H, *J* = 8,6 Hz), 7,35 (m, 5H, Cbz), 7,42 (d, 1H, 3-H, *J* = 8,6 Hz)



À une solution de **75** dans le CH₂Cl₂ (5 mL) est ajouté du périodine de Dess-Martin (5 éq.). Le mélange est alors agité pendant 2 h à ta puis dilué par AcOEt (5 mL) et une solution aqueuse de Na₂S₂O₃ 1 M (5 mL). Après 2 h d'agitation supplémentaires, la phase aqueuse est extraite par AcOEt (3 × 5 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées par une solution de NaCl saturée (5 mL), séchées (MgSO₄) et concentrées pour donner **76** (54 mg, 60 % sur 3 étapes) sous forme d'un solide beige après purification par chromatographie sur colonne (AcOEt / cyclohexane 8:2).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ=1,48 (s, 9H, CMe₃), 1,70 (m, 1H, 8-Hb), 2,67 (m, 1H, 8-Ha), 3,13 (dt, 1H, 9-Hb, *J* = 14,6 et 5,5 Hz), 3,22 (dt, 1H, 9-Ha, *J* = 14,6 et 5,5 Hz), 3,69 (d, 1H, 5-Hb, *J* = 16,6 Hz), 3,88 (d, 1H, 5-Ha, *J* = 16,6 Hz), 4,52 (m, 1H, 7-H), 5,07 (s, 2H, CH₂Ph), 5,58 (dl, 1H, NHCbz, *J* = 6,5 Hz), 6,33 (sl, 1H, NHBoc), 7,34 (m, 6H, Cbz + 2-H), 7,48 (d, 1H, 3-H, *J* = 8,8 Hz)

